COLLECTED REPRINTS

1959

FROM THE TOKAI REGIONAL
FISHERIES RESEARCH LABORATORY

東海区水産研究所業績集

昭和34年度

LIBRARY
NOV 7 1960
FISH & WILDLIFE SERVICE

東海区水産研究所
東京都中央区月島3号地
昭和35年4月

この業績集は東海区水産研究所研究報告以外の学術刊行物に発表された業績の集録である。

The present volume consists of reprints from scientific publications other than the Bulletin of the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory.

東海区水産研究所業績集

昭和34年度

目　次

水産資源

業績番号

奥谷喬司 (B-304)

熊野灘深海より得られた *Trophonopsis soyoae* sp. nov. クマノツノオリイレ（新種新称）について（英文）

土井長之 (B-325)

クロマグロと沿岸漁種との相互関係について

漁具漁法

野村正恒 (B-317)

二重刺網の基礎実験（英文）

水産化学及び利用

魚介肉蛋白

松本重一郎 (B-306)

イカ肉アクトミオシンの電気泳動的研究（英文）

松本重一郎 (B-307)

イカ肉水抽出液中の M- アクトミオシンと塩類抽出液中のアクトミオシン様蛋白との異同（英文）

右田正男・鈴木たね子 (B-308)

魚肉アクトミオシンの粘度に関する研究 —I. アクトミオシンの粘度測定に関する基礎的問題

右田正男・鈴木たね子 (B-320)

魚肉アクトミオシンの粘度に関する研究 —II. 試料の保存による粘度変化

右田正男・大竹茂夫 (B-326)

致死条件が肉蛋白におよぼす影響 —I. 即殺および苦悶死コイのミオシン区蛋白の組成

業績番号

ビタミン及び栄養成分

新間彌一郎・田中　稔　(B–310)
天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究 —Ⅷ. Chromatography による濃縮物の吟味

東　秀雄・山川健重・金子徳五郎・杉井麒三郎　(B–311)
天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究 —Ⅸ. メタノールを使用してA濃縮物を精製する方法

東　秀雄・金子徳五郎・杉井麒三郎・山川健重・井関重夫　(B–313)
天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究 —X. 弱化酸性白土を使用するビタミンA濃縮物の精製法

東　秀雄・村山繁雄・田部井菊子　(B–324)
魚肉肝臓のビタミンB_2含量について

東　秀雄・菊地　嶺・田部井菊子　(B–309)
酒肴とされている水産製品（主として塩醤品）の栄養成分含量

金田尚志・酒井寿恵・石井清之助　(B–312)
鯨肉の栄養価

食品保蔵・加　工

内山　均・天野慶之　(B–318)
含糖カマボコのネト形成機構 —Ⅲ. 加水分解速度恒数の測定及び過沃素酸ソーダ酸化法によるデキストラン及びネト物質の判定（英文）

横関源延　(B–319)
ねり製品の内部腐敗に関する研究—Ⅳ. *Bacillus* 属菌の繁殖におよぼす培地初期電位の影響

内山　均・天野慶之　(B–321)
魚肉ソーセージの軟化現象について—Ⅴ. 軟化原因細菌 *Bacillus circulans* の芽胞生育におよぼすピロ燐酸ソーダおよびソルビン酸の影響

岡田　稔・山崎惇子　(B–314)
ねり製品の足に対する澱粉の補強効果—Ⅲ. 合成樹脂粒子によるモデル実験

岡田　稔・山崎惇子　(B–315)
ねり製品の足に対する澱粉の補強効果—Ⅳ. 澱粉の物理的性質と補強効果

岡田　稔・山崎惇子　(B–316)
ねり製品の足に対する澱粉の補強効果—Ⅴ. 薬品処理澱粉の利用

TABLE OF CONTENTS

MARINE RESOURCES

Contribution Number

OKUTANI, T. (B—304)

A new muricid gastropod, *Trophonopsis soyoae*, sp. nov. from a deep water in Kumano-Nada, Japan.

DOI, T. (B—325)

On the predatory relationships among bluefin tuna and coastal fishes in the southern waters of Japan.

TRANSLATION IN REPRINT FILE

FISHING GEAR AND METHODS

NOMURA, M. (B—317)

Experimental fishing test on the efficiency of double gill net.

MARINE PRODUCT UTILIZATION AND CHEMISTRY

Muscle Proteins of Aquatic Animals

MATSUMOTO, J. J. (B—306)

An electrophoretic study of the squid actomyosin.

MATSUMOTO, J. J. (B—307)

Identity of M-actomyosin from aqueous extract of the squid muscle with the actomyosin-like protein from salt extract.

MIGITA, M. and SUZUKI, T. (B—308)

Studies on the viscosity of fish actomyosins—I.
Some fundamental problems on the viscosity of actomyosin.

MIGITA, M. and SUZUKI, T. (B—320)

Studies on the viscosity of fish actomyosins—II.
Viscosity change of carp actomyosin solution on storage.

MIGITA, M. and OTAKE, S. (B—326)

Influence of death conditions upon muscle proteins—I.
Composition of myosins from carps killed instantly and in anguish.

Vitamins and Nutritive Elements

SHIMMA, Y. and TANAKA, M. (B—310)

Studies on the economical manufacture of vitamin A concentrate from fish liver oil—VIII.
Chromatographical separation of vitamin concentrates.

HIGASHI, H., YAMAKAWA, T., KANEKO, T. and SUGII, K. (B—311)
Studies on the economical manufacture of vitamin A concentrate from fish liver oil—IX. Purification of vitamin A concentrate with methanol.

HIGASHI, H., KANEKO, T., SUGII, K., YAMAKAWA, T. and ISEKI, S. (B—313)
Studies on the economical manufacture of vitamin A concentrate from fish liver oil—X. Adsorption by weakened acid clay.

HIGASHI, H., MURAYAMA, S. and TABEI, K. (B—324)
Riboflavin contents in the liver of fish.

HIGASHI, H., KIKUCHI, R. and TABEI, K. (B—309)
Nutritive elements in salted marine appetizers.

KANEDA, T., SAKAI, H. and ISHII, S. (B—312)
Nutritive value of fin whale meat.

Food Preservation and Processing

UCHIYAMA, H. and AMANO, K. (B—318)
The mechanism of the slime formation on sugared Kamaboko—III. Identification of dextran by measuring the velocity constant of acid hydrolysis and by oxidation with sodium meta-periodate for "neto" compound.

YOKOSEKI, M. (B—319)
Studies on the internal spoilage of fish jelly products—IV. Effect of the initial oxidation-reduction potential of the medium upon the growth of *Bacillus* species.

UCHIYAMA, H. and AMANO, K. (B—321)
The softening spoilage of fish sausage—V. Effect of sodium pyrophosphate and sorbic acid on the growth of spore of *Bacillus circulans*.

OKADA, M. and YAMAZAKI, A. (B—314)
Enhancing effect of starch on jelly strength of fish meat jelly—III. Model experiments with synthetic resin particles.

OKADA, M. and YAMAZAKI, A. (B—315)
Enhancing effect of starch on jelly strength of fish meat jelly—IV. Relation between properties of starch and reinforcing ability.

OKADA, M. and YAMAZAKI, A. (B—316)
Enhancing effect of starch on jelly strength of fish meat jelly—V. Application of modified starch to Kamaboko manufacture.

水　産　資　源

MARINE RESOURCES

熊野灘深海より得られた *Trophonopsis soyoae* sp. nov. クマノツノオリイレ（新種新称）について

奥 谷 喬 司

A New Muricid Gastropod, *Trophonopsis soyoae*, sp. nov. from a Deep Water in Kumano-Nada, Japan*

Takashi OKUTANI

(Tokai Regional Fisheries Research Laboratory)

(挿図, Text-figs. 1－3)

The present paper is devoted to description on a deep sea gastropod of Muricidae which seems to be a new to science. The specimen was collected with a beam-trawl along with some demersal fishes and holothurians of the genus *Peniagone* on June 27, 1955, from a depth of 2050m. off Kumano-Nada, southeast coast of the Kii Peninsula, during a survey cruise conducted by the R. V. *Soyo-Maru*.

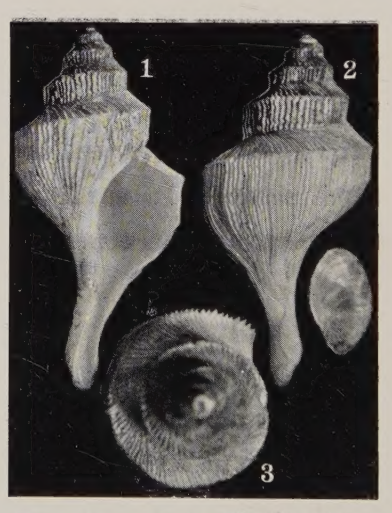
Thanks are extended to Mr. Z. Nakai, Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, who kindly placed the specimen at the present author's disposal, and to crew of the R. V. *Soyo-Maru* for their cooperation in collecting the material.

Trophonopsis soyoae, sp. nov.

Shell thin, delicate, fusiform; whorls 5 in number, apical two thirds being a protoconch which is nearly eroded, and the rest provided with 2 weak spiral ribs; the area between the hindmost rib and the suture weakly slanting; the periphery is

* Contribution B-304 from the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory.

closely lamellated axially all over; the lamellae are very depressed, delicately edged and well preserved, and slanting on the hindmost area, while those below the shoulder nearly vertical and slightly recurved on the spiral ribs, *ca.* 80 in number on the last whorl and *ca.* 70 on the penultimate whorl; aperture pyriform, smooth internally, with produced open canal which is slightly recurved; the caudal portion is ornamented with very delicate and crowded curving lines; coloration dull white generally; operculum horny and sub-ovate in outline, yellow in color.



Text-figs. 1—3 · *Trophonopsis soyoae*, sp. nov.
Holotype, 33.2×15.7mm.

Measurement : Height, 33.2 mm., diameter 15.7mm., major diameter of the operculum 9.3 mm. (Holotype)

Locality : Lat. 33°48.7′ N., long. 136° 34.8′ E., the sea of Kumano-Nada, off Miki-Saki, Kii Peninsula. Depth 2050m., blue-coloredmud.

Remarks : This exquisite species distantly resembles *Trophonopsis crystallinus* Kuroda, but the latter has 4 strongly erect ribs and 50 lamellae on the body whorl instead of 2 weak ribs and 80 lamellae on this new species. This is also resembling *T. dalli* Kobelt from the Bering Sea in general appearance, but the latter has 15–20 spines on the whorl.

Only the type specimen of this new species was then collected, but accompanying with it one water-worn specimen of *Ancitrolepis* cf *trochoideus* (Dall) and 6 dead shells of *Euclio pyramidata* (L.) were taken by the same haul. Holo-type is preserved in the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Tokyo. Tht records of the molluscan shells alive from such a large depth in Japanese waters have been scarcely available.

1955 年7月蒼鷹丸によつて熊野灘2050m. の深海底から採集された *Trophonopsis* に属する新種, *T. soyoae* ps. nov クマノツノオリイレについて記載した。本種の著るしい特徴は, 螺層に弱い2本の螺脈と, 非常に細密な縦襞を有することで, 襞は体層に約80, 次体層に約70あつて, 肩の所は螺脈のために僅かに反つている。本新種は邦産中では *T. crystallinus* Kuroda チヂワツノオリイレに近縁であると考えられるが, 後者は強い螺脈を4本そなえ, 又螺層の縦襞が体層で約50を算える点で前者と異なる。我が国近海において斯様に深い所から採集された貝類に関する報告は稀である。

レイン：タコの王国 Lane, Frank W. 1957. Kingdom of the Octopus: The life-history of the Cephalopoda. Jarrolds Publishers, London. 菊判, 287頁.

著者はどういう人か私はよく知らない。本書は“タコの王国”と題するが副題にもあるように頭足類全般の事項について平易に解説したもので, 一般人士の参考に供する目的のものであるが専門的に見ても甚だ有益である。内容は‘頭足類・食餌・天敵・運動・行動・色彩・発光・生殖・漁獲・経済的方面・危害・海魔 Kraken’の諸章に分け, 原色図版4枚, 黒白図版48面の外挿図多数を配している。要するに頭足類全体について形態・生態・人生関係に関する豊富な資料が集めてあり, 著者は内容全体について Akimushkin (ソ連), Cotton(南豪), Pickford (北米), Voss (北米) 諸博士に校閲を願つて, これら諸氏は著者の多数の質問に答えてくれたと云う。末尾に頭足類の分類表と術語解, 参考文献表を添えてある。欧米人は南欧人を除いて一般にイカ・タコ類を好まず, むしろ嫌悪する性質があると聞いているが, このような教養参考書を著すために多大の労を惜しまなかつた著者は篤志家であろうし, 又その努力は感謝さるべきである。定価30シリングで丸善で1800円であつた。 以上 (滝 巌)

クロマグロと沿岸魚種との相互関係について

土 井 長 之

(1959 年 10 月 12 日受理)

TRANSLATION IN REPRINT FILE

ON THE PREDATORY RELATIONSHIPS AMONG BLUEFIN TUNA AND COASTAL FISHES IN THE SOUTHERN WATERS OF JAPAN

Takeyuki Doi*

As to theoretical models of prey-predator relationships among fishes, VOLTERRA's differential equations are well-known. Nevertheless, there are a great deal of criticism that those equations cannot stand for real circumstances of community of fishes or animals. But as the equations are convenient to examine the community problems of fishes, discussions about the equations are now often presented.

This report is a trial to prove whether VOLTERRA's equations are applicable to the predatory relationships between bluefin tuna, a predator, and coastal fishes in the southern waters of Japan. An electronic analogue computer was employed in solving the equation which is a kind of non-linear differential equations.

The following are the results obtained. First, relationships between bluefin tuna and common squid in the waters for the years 1951 to 1955 have been examined. In Fig. 2 the broken line, generated by a function fitter of the analogue computer, represents the actual variations in the stock of common squid for the years 1951 to 1955, and the other curves stand for the theoretical variations in the bluefin tuna computed by the analogue computer for various values of a parameter of VOLTERRA's equation. The graphical form in the middle of theoretical curves is similar to an actual variation of bluefin tuna. Therefore, as far as those years are concerned, it seems that these two fishes are in prey-predator relationships fitted to VOLTERRA's equation.

In the second place, for the years 1951 to 1956 instead of to 1955, it was found impossible to make a theoretical graphical form similar to actual variations of bluefin tuna. But when total catch of coastal fishes is considered instead of common squid alone, it is possible to find out the predatory relationships between bluefin tuna and the sum of coastal fishes for the year 1951 to 1956, as shown in Fig. 4.

From these results it is concluded that bluefin tuna and coastal fishes including common squid are in predatory relationships in the southern waters of Japan.

1. まえがき

生物社会における競存関係の理論的な取扱としては VOLTERRA の方程式がよく知られている。この式がそのまま生物相互間の現象にあてはまるとは現今では考えられていないが，それにもかかわらず，今だにこれについての論議がなされている[1-6]ことは，近似的にはある程度この方程式によつて競合関係の説明がつくためである。この報告はクロマグロと沿岸魚種との関係が VOLTERRA の方程式によつてどの程度に説明されるかを定性的に調べたものである。VOLTERRA の式は数学的にはいわゆる非線型の式であるから一般的にはなかなか解き難いが[6]，アナログコンピュ‥ターを使えばこの点は克服される。

2. アナログコンピューターによる VOLTERRA の式の解法

捕食魚の資源量を y，その餌料生物の量を x とすれば x, y の時間的変化を規制する VOLTERRA の式は

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab.).
東海区水産研究所業績 B 第 325 号

つぎのようになる。

$$\frac{dx}{dt} = Ax - By \cdot x \quad \cdots\cdots(1)$$

$$\frac{dy}{dt} = -Cy + Dx \cdot y \quad \cdots\cdots(2)$$

ここで B および D がそれぞれ生物相互間の関係をあらわす係数である。この報告では y としてクロマグロ[2),3)], x としてスルメイカあるいは沿岸魚種の総量を取扱つて計算してみた。

(1) 式と (2) 式の連立微分方程式を解いて実際の漁獲変動を比較することをアナログコンピューターで行う場合，二通りの計算方式が考えられる。1つはある年 ($t=0$) の実際の資源量を (x_0, y_0) とすれば，これを初期条件として翌年 ($t=1$) のもの (x_1, y_1) は連立方程式を解いて求めることができる。つぎに (x_2, y_2) をもとにして同様に (x_3, y_3) を求め得る。これを順次くり返すことにより x と y の理論上の時間的変化が求められる。この形と実際の漁獲変動の形とを比較することによつて実際の変化が VOLTERRA の式で解釈されるか否かがわかる。4つのパラメターについてはそれぞれいろいろな値を入れてみて計算しなければならないのはもちろんで，いくつかの試行のうち形の合うものがあればその値を魚種間関係のパラメターであると推定する。

第2の方法は y として実際の捕食魚の時間的変化をとり（これはアナログコンピューターでは任意函数発生装置によつて可能である），(1) 式のみを解いて x の理論的な時間的変化を求め，これが実際の x と合うか否かを比較する方法である。また逆に x の実際の餌料魚種の時間的変化を任意発生函数発生装置でとつて (2) 式のみによつて y を解いてもよい。この報告では第2の方法によつた。

3. クロマグロとスルメイカの関係

クロマグロと沿岸魚種との関係は南海区水域の問題として取上げられた歴史がある[2),3)]のでこの資料によつて計算をすすめた。Fig. 1 は南海区水域の昭和 26 年より 31 年までのクロマグロとスルメイカの年変化であつて，太い実線が捕食魚としてのクロマグロ，点線はクロマグロの餌となるスルメイカである。沿

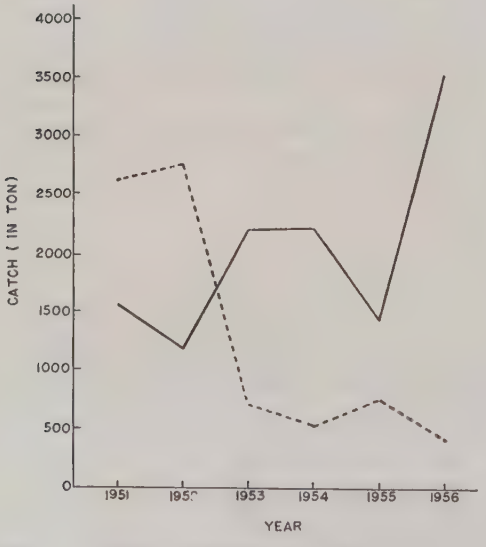


Fig. 1. Yearly variations in catch of bluefin tuna (solid line) as a predator and common squid (dotted line) as a prey in the southern waters of Japan for the years 1951 to 1956.

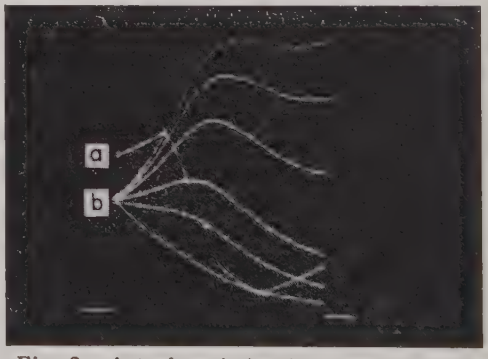


Fig. 2. Actual variation in common squid stock for the years 1951 to 1955 and theoretical variations of bluefin tuna computed by an analogue computer from Volterra's equation of predatory relationships. Broken line (a), generated by a function fitter of the analogue computer, represents the actual variation of common squid and assembly of curves (b) are the graphical forms of the theoretical variation of bluefin tuna for various values of a predatory parameter. One of the theoretical variations (the third line from above) approximates to actual one shown in Fig. 1.

岸魚種のうちでは，スルメイカがクロマグロの餌として比重が大きいようである。

スルメイカを (1), (2) 式の x とし，その時間的変化が明らかである場合の理論的な捕食魚の量 y をアナログコンピューターで求めたのが Fig. 2 である。

すなわち，昭和26年より30年までのスルメイカの年変化 x を任意函数発生装置でつくつたものが Fig. 2 の折線 (a) であり，これに対応する y が曲線群 (b) として求められている。Fig. 2 では，(2) 式の D は 0.6 で C を 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0 (曲線群の上より) に変えた場合の曲線群である。実際のクロマグロの年変化と対比してみると $C=0.2$ の場合にほぼ同じ形になる。

生物群集の増大には密度効果を無視することはできない。これを考慮すると，(1), (2) 式の代りに

$$\left.\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= Ax - By\cdot x - \alpha x^2\\ \frac{dy}{dt} &= -Cx + Dx\cdot y - \beta y^2\end{aligned}\right\} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (3)$$

と書くことができる。α, β が密度効果の係数である。この場合についてアナログコンピューターで実際に計算してみると，解の形としては密度効果のない場合と殆んど同じようなものが得られる。しかしその場合の C や D の係数の値は密度効果のない場合とは異つていることはもちろんである。このように密度効果を考えると否とにかかわらず定性的な形としては同じものが得られることがわかつたので，以下の取扱は $\alpha=\beta=0$ として考えることにする。

つぎにスルメイカの年変化として昭和 31 年までのをとつた場合を計算してみると，(2) 式の C や D をいかに変えてもクロマグロの年変化と似た形を y として得ることができなかつた。すなわち昭和 30 年までならばスルメイカとクロマグロは (1) 式 (2) 式であらわされる捕食魚被捕食魚関係として解釈することもできようが，昭和 31 年の変動はそれだけでは説明し得ないことが明らかになつた。

4. クロマグロと沿岸魚種との関係

スルメイカとの関係のみではクロマグロの変動を説明できなくなつたので，次に沿岸魚種との関係をみてみよう。Fig. 3 におもな沿岸魚種の年変化を示してある。点線はそれらの総量である。

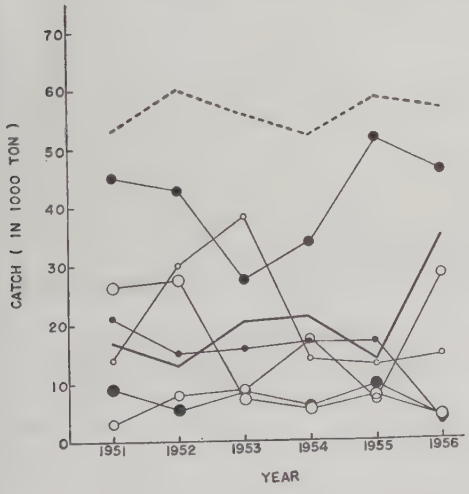


Fig. 3. Yearly variations in catch of bluefin tuna (thick solid line) and coastal fishes for the years 1951 to 1956.
◐: sardine ○: pampanos
●: anchovy ○: mackerels
●: round herring ○: common squid
Dotted line: total of coastal fishes.

Fig. 4. Theoretical variation of total stock of coastal fishes (curve, b) and actual variation of bluefin tuna (broken line, a) for the years 1951 to 1956. Explanations for solving the theoretical one are the same as in Fig. 2. As the actual variation of total of coastal fishes is similar to theoretical one, it is not unreasonable to conclude that bluefin tuna and coastal fishes are in predatory relationships.

今クロマグロの昭和 26 年より 31 年までの年変化 y を任意函数発生装置でつくつて，餌料魚種 x を理論的に求めるとすると (1) 式のみを用いればよい。Fig. 4 はその結果であつて，折線 (a) は実際のクロマグロ (y) であり，曲線 (b) は x の理論値で，パラメターの値は (1) 式の $A=0.96$, $B=1.6$ の場合である。この x の形と沿岸魚種の年変化と形の似ているものは魚種別にはなく，沿岸魚種総量 (Fig. 3 の点線) が似ている。このことはクロマグロと沿岸魚種総量との間には捕食魚——被捕食魚関係があり，それは VOLTERRA の式で説明されることも可能であることを示している。

5. 考　　察

南海区水域の魚種間関係が VOLTERRA の式であらわされるか否かをアナログコンピューターで計算した結果を示したのが以上述べてきたところであり，クロマグロとスルメイカとは昭和 30 年までは捕食魚——被捕食魚関係がなり立つが，昭和 31 年も含めた資料ではこの関係は見出されず，その場合にはクロマグロと沿岸魚種総量とにこのような関係が見出された。なお，つぎのような 2, 3 の前提があることを注意すべきである。

以上の取扱では資源の大きさは漁獲量と相対的に比例することを仮定している。漁獲量は分つているが，資源量は不明である。普通には資源量の指数として単位漁獲量当りの漁獲量を以つてするが，一般にそれと漁獲量とは比例することが多いので，この報告では漁獲量の変化で以つて資源量の目安としている。このことがみとめられない場合には相対資源量で計算しなければならない。

魚種間関係のパラメターの推定値は一応記してあるが，この値はあくまでも定性的なものであつて，たとえば密度効果を考慮するならば推定値は変つてくる。だが形としては大体同じものを得るから VOLTERRA の式があてはまるか否かを判定する定性的な考察にはどちらでも同じである。ゆえにパラメターの推定値は絶対値とはみなさず相対値としてみるべきものである。

これらの前提あるいは仮定のもとで，クロマグロとスルメイカまたは沿岸魚種との関係が捕食魚——被捕食魚関係として考えてもよいことがわかつた。しかしクロマグロの胃内容物の種類と量，クロマグロの分布区域の季節的変化，クロマグロ体重分布の経年変化[7] 等を考えに入れて取扱つたものでなく，統計資料よりのみの結論であるからこのような生物学的基礎については別に検討されねばならないだろう。

終りにアナログコンピューターの計算に多大の労をわずらわした嶺山美和子氏に深く感謝する。

文　　献

1) 横田滝雄: 魚類の群聚について，昭和 30 年底魚担当官会議資料，(1955).
2) 横田滝雄・浅見忠彦: 昭和 28 年鰮資源協同研究経過報告，南海区水研，(1956).
3) 農林水産技術会議: 昭和 31 年度水産資源に関する研究協議会経過概要，(1957).
4) BARTLETT, M. S.: On theoretical models for competitive and predatory biological systems, *Biometrika*, **44**, 27～42, (1957).
5) LESLIE, P. H.: An Analysis of the data for some experiments carried out by Gause with populations of the protozea, *Paramecium aurelia* and *Paramecium caudatum*, *Biometrika*, **44**, 314～327, (1957).
6) ————: A Stochastic model for studying the properties of certain biological system by numerical methods, *Biometrika*, **45**, 16～31, (1958).
7) 山中　一: クロマグロの研究—I. 漁獲物の体生分布にみられる Mode，南海区水研報告，**9**, 125～135, (1958).

漁　具　漁　法

FISHING GEAR AND METHODS

EXPERIMENTAL FISHING TEST ON THE EFFICIENCY OF DOUBLE GILL NET

Masatsune NOMURA*

(*Received Oct. 19, 1959*)

Introduction

Use of nylon cord for gill nets has become increasingly popular among fishermen because its greater pliability and less visibility under water than ordinary materials have been proved advantageous for promoting fishing efficiency. Along with this progress in material, construction of the gear has also made a notable improvement by adopting the so-called trammel type to bottom gill nets.

Of several merits the trammel net has, one is that it can entangle fish without so much selectivity of size of fish as in ordinary single gill nets. In another advantage, we may be able to alleviate inclination of the net due to current, and thus to extend an effective width of the net, for it has both buoyancy and sinking power greater than the single gill net. The fact suggests a possibility where the trammel net is operated not only in a current suitable for the single net but under stronger one, as well. On the other hand, some of disadvantage the trammel net has consist in difficulties of handling it when casting or hauling it up, removing the catches, repairing and so forth. Therefore, this mode of net construction can not be recommended for ordinary drift nets which are supposed to seize a large amount of fishes—say, sardine—at a time. Nevertheless, in other types of fisheries, the trammel net may be like to demonstrate reasons for which it may be superseded for the single drift net. Up to the present time, single drift net has been a major type of gear in northern North Pacific for salmon fishing. As yet the ratio of salmon falling off the net has been supposed to be some extent partly due to the mesh size unfitted for some individuals and partly due to a failure in perfectly entangling the catch. Moreover, the density of fish distributed in that part of the sea is comparatively thin so that the mean amount of catch per unit of drifters remains only at about ten individuals. Judging from these points, it is worthy of investigation whether or not the efficiency of salmon fishing can be risen by the use of trammel net. With this view in mind, the author carried out preliminary experiments to deduce fishing efficiency of the trammel net at a fish farm of the Tokyo University of Fisheries, at Ōizumi, Nagano Prefecture in November 1958, using the rainbow trout *Salmo irideus* (GIBBONS) reared there.

* Tokai Reg. Fish. Res. Lab., Tsukishima, Chuo-ku, Tokyo, Japan (野村正恒, 東海区水産研究所)
Contributions B, No. 317 from the Tokai Reg. Fish. Res. Lab.

Method and condition of the experiments

In discussing the function of trammel net, use of a double net is thought to be convenient for the experimental purpose. Because the double net will be enable us to examine difference in fishing efficiency between large mesh webbing on one side and small mesh webbing on the other as fish approach to either side of the net.

In the experiments five units of the double nets had each different small mesh webbing from the others in regard to either slackening b against the large mesh webbing, shortening s, or mesh size L, though the net N_{D2} is regarded as the standard type in these experiments. The value of b is represented by the ratio of the width of small mesh webbing against the width of large mesh webbing when the both are hanged individualy in vertical under the condition of given shortening in horizontal respectively. An ordinary gill net (hereinafter called the single net) has been used as the control. The values of these characters are indicated in Table 1.

Table 1. Construction of small mesh net used for the experiment

Type of net		Slackening "b"	Shortening "s"	Mesh size "L"	Width × length (number of mesh)	Tank	Date (1958)	Testing time
Single Net	N_S	—	0.45	1.8*sun** (5.45*cm*)	20×132	P	11.12	17.00~22.00
							11.13	03.00~06.00
						Q	11.13	17.00~22.00
							11.14	03.00~06.00
Double Net	N_{D1}	1.1	0.55	(,,)	19×168	P	11.11	17.00~22.00
							11.12	03.00~06.00
						Q	11.10	17.00~22.00
							11.11	03.00~06.00
	N_{D2}	1.3	,,	(,,)	23×168	P	11.10	17.00~22.00
							11.11	03.00~06.00
						Q	11.11	17.00~22.00
							11.12	03.00~06.00
	N_{D3}	1.5	,,	(,,)	26×168	P	11.13	17.00~22.00
							11.14	03.00~06.00
						Q	11.12	17.00~22.00
							11.13	03.00~06.00
	N_{D4}	1.3	0.45	(,,)	24.5×132	P	11.15	17.00~22.00
							—	— —
						Q	11.14	17.00~22.00
							11.15	03.00~06.00
	N_{D5}	1.3	0.55	1.4*sun* (4.24*cm*)	29×216	P	11.14	17.00~22.00
							11.15	03.00~06.00
						Q	11.15	17.00~22.00
							—	— —

* One *sun* equals 3.03 cm.

Amilan (Toyo nylon) 210 D/6, was used for the single net as well as the small mesh webbings of the double nets. The scale of the completed double nets may be represented by that of the large mesh webbings which had the same specifications among the five units as follows:

Material:	Amilan 210 D/9
Mesh size:	7.2 *sun* (21.8 centimeters)
Shortening:	30 percent
Completed length:	4 meters
Completed width:	1 meter.

The accessories consisted of : float line, 16 monme twine, single with 20 pieces of synthetic float, each having buoyancy of 25 gr.; lead line, 3 monme twine, single, with 70 pieces of lead each weighing 4.3 gr. under water.

Two concrete tanks, P and Q, were used. Their dimensions were about 25×5×2 meters with the depth of water being 1.4 meters. In tank P 1,200 individuals of the rainbow trout were released, and 600 in tank Q. The average body length of the former was a little smaller than what seems to fit to the mesh size of 1.8 *sun* (5.45 centimeters), while the latter were fairly larger.

In order to avoid the influence of moon light, the experiments were conducted for about a week with the lunar chosen at the center of the period. Every day any one of the nets was tested in either one of the tanks, first for five hours from 17–00 till 22–00 involving evening twilight and subsequently for another three hours from 03–00

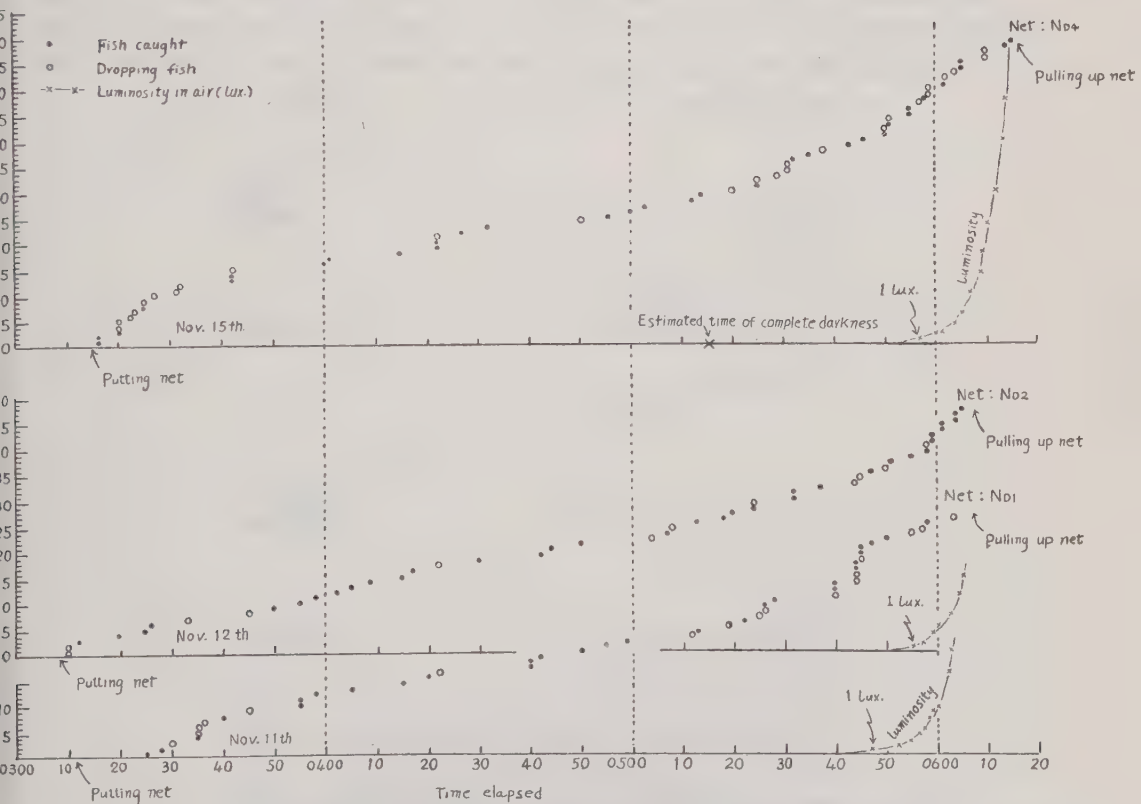


Fig. 1. Fishing condition in tank Q according to the time from 03.00 to 06.00 hours (example).

till 06–00 involving morning twilight. The net was made to float at the middle of the tank and kept clear off the walls and the bottom. Two strings, each fastened to either end of the float line, were held by hand on two sides of the walls. Thus, a shock produced by fish touching the net was transmitted to the hand with a pretty good sensibility. This shock was counted as "touch" to distinguish it from "catch". The catch, though it took place in various parts of the net, was larger in number at the lower portion than the upper.

Whenever the observers felt the shock, the net was slowly pulled out of the water. A fish caught was removed from the net and released again into the tank. Observation data put on record include: time of fishing, part of net, part of the body or status entangled, swimming direction when fish made contact with the net, symbol "+" denoting the direction from small mesh side to large mesh, and "−" *vice versa*. The numbers of fish that fell off the net half-way were separately noted as "drop". As an example, an accumulated numbers of fish according to the time elapsed in the morning in tank Q are shown in Fig. 1.

Discussion on the results

The relations between the length and gill circle of the fish population were determined as plotted in Fig. 2 on the basis of 100 individuals sampled at random by a dip-net from tank P, and fifty from tank Q, both representing nearly 10 percent of the

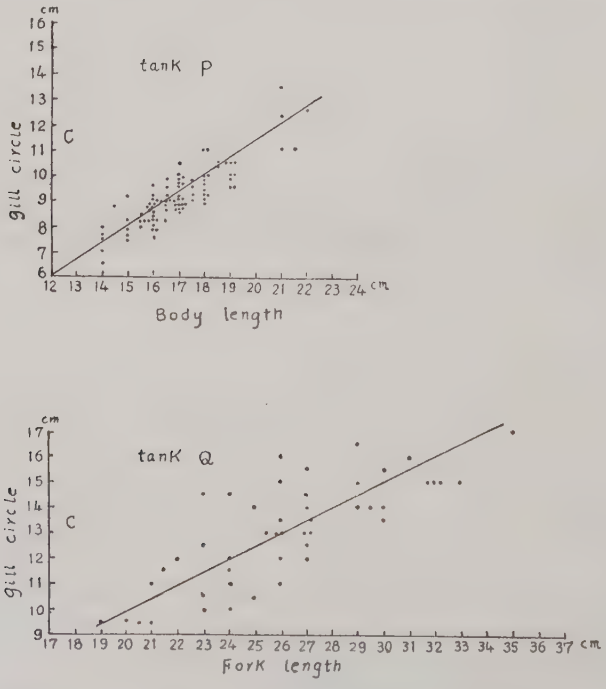


Fig. 2. The relation between length and gill circle of the population in the tanks.

stock in either tank.

In the measurement, the body length (from the tip of the snout to the posterior end of the vertebra) was used for fish from tank P, and the fork length (from the snout to the cartilaginous median part of the caudal fork) for fish from tank Q. In the following discussion, the length of fish should refer to either one of these measurements depending on the source of fish specified.

Fig. 3 shows the length distributions of the sampled fish and of those caught in each experiment. According to a previous study (Nomura, 1959) dealing with relation

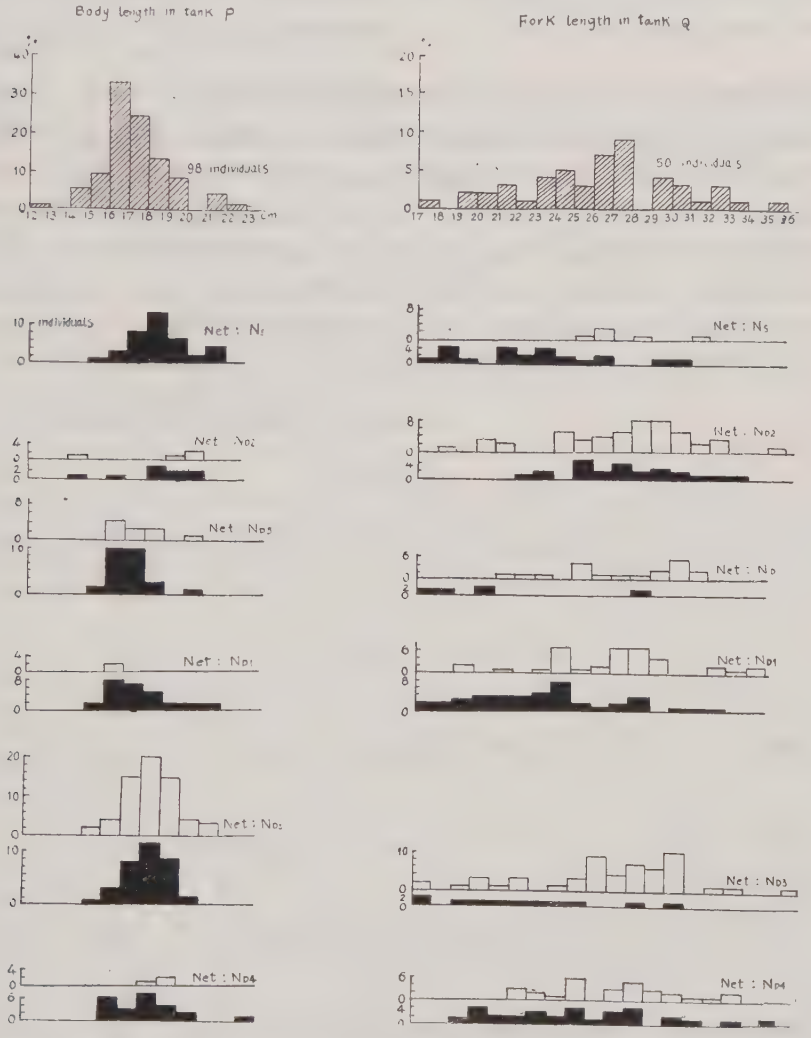


Fig. 3. The length distributions of the rainbow trout population in the tanks and of fishes caught by experiments.

▨ : length distribution of fish sampled by scooping

□ : length distribution of fish caught by entangling

■ : length distribution of fish caught by gilling

Blacket shows the length range suitable for 5.5 centimeter mesh.

of the gill circle of fish to certain mesh size, optimal gill circle to a 5.5-centimeter (1.8 *sun*) mesh can be roughly calculated as 9.5 to 10.5 centimeters. By reference to Fig. 2 this can be converted into an optimal length, which is 17 to 19 centimeters in the body length for the group in tank P and 19 to 21 centimeters in the fork length for the group in Q. Since the group P had the mode of length distribution at 16 to 17 centimeters, while the group Q at 27 to 28 centimeters (Fig. 3), the former was a little smaller, and the latter fairly larger, than the optimal size of the mesh referred to above. Thus, the fish in the both tanks looked possessing satisfactorily requirements needed for investigating differences in mesh selectivity of the gill nets under test.

1. Characteristics of the nets relevant to length distribution

As is evident from Fig. 3, the mode of length distribution of catches by the single net was nearly the same with the optimal length calculated for the 5.5 centimeter mesh. In case of the group Q large-sized fish, the length range produced by the single net was considerably narrower than the length range by anyone of the double nets, with a few catches entangled in net being somewhat larger than the average. This was quite natural for the single net in view of its fishing function. On the other hand, efficiency of the double nets was higher for large fish of group Q than for those having

Table 2. Characteristic values showing relative

Tank P

	C_G		C_T		D		A	T	f	f'	$\frac{C_G}{C_D}$	$\frac{D}{C+D}$	$\left(\frac{C}{C+D}\right)_+$	$\left(\frac{C_T}{C+D}\right)_+$	$\left(\frac{C}{C+D}\right)_-$	$\left(\frac{C_T}{C+D}\right)_-$
	+	−	−	+	+	−										
N_S																
	41		**0**		**18**		**60**	**119**	.34	.50	∞	.31				
N_{D1}	**21**	**7**	**2**	**0**												
	28		2		**18**		**29**	**77**	.39	.62	14	.34				
N_{D2}																
	24		**13**		**13**		**37**	**87**	.43	.58	1.9	.26				
N_{D3}	**19**	**30**	**49**	**17**	**2**	**15**										
	49		**66**		**17**		**37**	**169**	.68	.78	.74	.13	.97	.70	.76	.27
N_{D4}	**13**	**9**	**2**	**1**	**2**	**4**										
	22		**3**		**6**		**34**	**65**	.38	.48	7.3	.19	.89	.12	.71	.07
N_{D5}	**20**	**12**	**9**	**4**	**8**	**17**										
	32		**13**		**25**		**40**	**110**	.41	.64	2.5	.36	.78	.24	.48	.12

Heavy numerals indicate the number of fish gilled (C_G), trammeled (C_T), dropped (D), touched (A) or total of these (T).

the optimal size to the 5.5-centimeter mesh. However, there was no appreciable difference between the double and the single nets in catching the smaller fish in tank P. When N_{D2} and N_{D5} of the double nets in tank P are compared with each other, the latter net with smaller mesh appears to control the length of fish more strongly than the former. Further comparison between N_{D2} and N_{D1} with reference to slackening b, and between N_{D2} and N_{D4} in regard to shortening s revealed that the mode of length distribution tends to incline to the smaller side when the values of b or s becomes lower than those of N_{D2}.

2. Analyses of Fishing Efficiency

In detailed examinations of fishing efficiency of the nets under study, important factors that have to be considered may be expressed in the following formulae:

$$\text{Fishing rate:} \quad f=\frac{C_G+C_T}{T}=\frac{C}{T},$$

where C_G: the number of gilled fish,
C_T: 〃 〃 trammeled fish,
C : 〃 〃 catch,
T : the sum of fish including catch, "drop" and "touch".

efficiency of each net in the experiment.

Tank Q

C_G		C_T		D		A	T	f	f'	$\frac{C_G}{C_T}$	$\frac{D}{C+D}$	$\left(\frac{C}{C+D}\right)_+$	$\left(\frac{C_T}{C+D}\right)_+$	$\left(\frac{C}{C+D}\right)_-$	$\left(\frac{C_T}{C+D}\right)_+$
+	−	+	−	+	−										
23		6		43		169	241	.12	.30	3.8	.60				
23	17	35	5	35	13										
49		40		48		122	259	.34	.53	1.2	.35	.66	.34	.63	.14
9	17	45	14	13	11										
26		59		24		71	180	.47	.61	.44	.22	.81	.67	.74	.33
10	1	49	7	6	38										
11		56		44		47	158	.42	.70	.20	.40	.91	.75	.17	.15
9	24	23	7	17	31										
33		30		48		93	204	.31	.54	1.1	.43	.65	.47	.50	.11
1	4	14	7	9	11										
5		21		20		41	87	.30	.53	.24	.44	.63	.58	.50	.32

+: Fish coming from small mesh net
−: Fish coming from large mesh net.

Assumed fishing rate: $f' = \frac{C_G + C_T + D}{T} = \frac{C + D}{T}$,

where D is the number of "drop".

Ratio of gilled fish to trammeled fish: C_G/C_T.

Ratio of "drop" to catch: $\frac{D}{C+D}$.

Fishing ratio when fish comes from small mesh side (+): $\left(\frac{C}{C+D}\right)_+, \left(\frac{C_T}{C+D}\right)_+$.

Fishing ratio when fish comes from large mesh side (−): $\left(\frac{C}{C+D}\right)_-, \left(\frac{C_T}{C+D}\right)_-$.

The values of these factors have been computed on the basis of the data from every experiment, and summed up values in the morning and in the evening according to respective net and tank as indicated in Table 2. In the table, A represents the number of "touch."

1). Comparative values between the single net and double nets.

Of all the nets under report, the single net had fishing rate, f, at the lowest, especially in tank Q which contained comparatively large individuals. In tank Q, moreover, the net presented the ratio of "drop", $\frac{D}{C+D}$ expressively large, and the value of C_G/C_T high as well. These are the points that make a difference between the single net and the double ones. The reason of the difference may be attributed to a limited function of the single net as it would offer few chances for catching fish though they may touch the net; even if fish had been in a state of being caught in the net, they were liable to drop half-way during hauling up the net. In fact, most of catches were found in a gilled state but rarely trammeled.

2). Effects of different slackening, shortening, or small mesh-size compared between N_{D2} and the other double nets.

With reference to the values in Table 2. comparisons have been made between: different slackening b which is 1.1, 1.3 or 1.5 for N_{D1}, N_{D2}, or N_{D3}, respectively: different shortening s which is 0.55 for N_{D2} and 0.45 for N_{D1}: different small mesh-size L, 5.45 centimeters for N_{D2} and 4.24 centimeters for N_{D5}.

Except these items specified above, the net had the same conditions with one another. From the results summarized in Table 3, it can be concluded that anyone of the double nets surpasses the rest in fishing function when it has either slackening, shortening, or size of small mesh, larger than the others.

In the both tanks, fishing ratio from small mesh side, $(C/C+D)_+$, is higher than the ratio from large mesh side, $(C/C+D)_-$.

This fact indicates the special character of fishing function of double nets.

3. The value of m based on the areal margin of small mesh net versus large mesh net in double net construction.

Here let us calculate an assumed value m that represents the ratio of area of small

Table 3. Comparative functions of a net different from the others

Distinction of a net from the others	Fishing rate f			Rate of "drop" $\frac{D}{C+D}$			Ratio of gilled to trammeled C_G/C_T			Fishing from small mesh $\left(\frac{C}{C+D}\right)_+$			Fishing from large mesh $\left(\frac{C}{C+D}\right)_-$		
	larger in slackening	larger in shortening	larger* in mesh	larger in slackening	larger in shortening	larger* in mesh	larger in slackening	larger in shortening	larger* in mesh	larger in slackening	larger in shortening	larger* in mesh	larger in slackening	larger in shortening	larger* in mesh
Tank P (fish size comparatively small)	large	large	no difference	small	arge	small	small	small	small	—	—	—	—	—	—
Tank Q (fish size pretty large)	obscure	large	large	obscure	small	small	small	small	large	large	large	large	obscure	large	large

* The mesh size of so called "large in mesh" is a little larger than the gill circle of fish in tank P and "smaller in mesh" is a little smaller.

mesh net to area of large mesh net when both have the same 30 percent shortening, and this can be obtained by the following procedure. Now, a double net is constructed with,

(a) shortening of large mesh net at 30 percent,

(b) shortening of small mesh net as 100s percent,

(c) vertical slackening of small mesh net against large mesh net denoted as b,

(d) large mesh net is spread in square unit area r^2.

The length of small mesh net l stretched in the horizontal direction equals as $\frac{r}{1-s}$ When l' denotes l shortened by 30 percent,

$$l' = \frac{r}{1-s} \times 0.7 \ .$$

As to the width of small mesh net $b \times r$ under shortening s is

$$b \times r = a \times n\sqrt{2s-s^2} \ ,$$

where a is the mesh size, and n the number of meshes along the width of the net. The width vertically stretched is

$$a \times n = \frac{b \times r}{\sqrt{2s-s^2}} \ ,$$

therefore, the vertical length of small mesh net shortened by 30 percent, l'', is

$$l'' = \frac{b \times r}{\sqrt{2s-s^2}} \times 0.71 \ .$$

Then, the value of m can be given as

$$m = \frac{l' \times l''}{r^2} = \frac{\frac{0.7}{1-s} r \times \frac{0.71 \times b \times r}{\sqrt{2s-s^2}}}{r^2} = \frac{b}{2(1-s)\sqrt{2s-s^2}} \ .$$

The values of m computed for the double net under study according to respective s and b are given in Table 4. Fig. 4 shows the relation between these values of m and f, C_G/C_T, $\left(\frac{C}{C+D}\right)_+$, and $\left(\frac{C_T}{C+D}\right)_+$ as in Table 2.

Table 4. The value of m of testing mets

	N_{D1}	N_{D4}	N_{D2}	N_{D3}
S	.55	.45	.55	.55
b	1.1	1.3	1.3	1.5
m	1.37	1.40	1.61	1.86

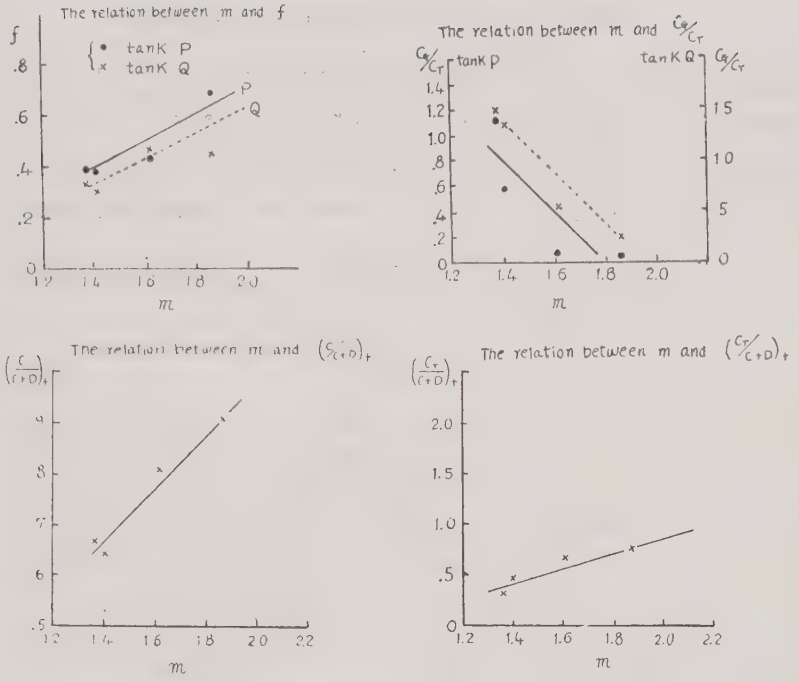


Fig. 4. The relation between m and the other values.

In Fig. 4 it is evident that these are nearly linear relationship between these values. Particularly the fishing rate, f, becomes greater with the increase in the value of m, at least within the range of m shown in Table 4.

In the above discussion, s has been used as the horizontal shortening and b as the vertical slackening. If we make another expression about this same construction of net such as s' expresses the vertical shortening and b' the horizontal slackening,

$$s' = \frac{\frac{b \times r}{\sqrt{2s - s^2}} - r}{\frac{b \times r}{\sqrt{2s - s^2}}} = \frac{b - \sqrt{2s - s^2}}{b}$$

Since $b' \times r = \frac{r}{1-s} \times \sqrt{2s' - s'^2}$, then b' is

$$b' = \frac{\sqrt{2s' - s'^2}}{1-s}.$$

Therefore the value m can be expressed as,

$$m = \frac{b}{2(1-s)\sqrt{2s - s^2}} = \frac{b'}{2(1-s')\sqrt{2s' - s'^2}}.$$

Under various combinations of s and b conceivable for a practical net construction, s', b' and m have been calculated from the above equations and arranged in Table 5 in the increasing order of m.

Table 5. Values of m under various constructions

S	0.55	0.50	0.45	0.55	0.50	0.55	0.50	0.60	0.55	0.50	0.60	0.55	0.60
b'	1.28	1.38	1.40	1.50	1.50	1.62	1.58	1.62	1.71	1.64	1.78	1.78	1.90
b	1.10	1.20	1.30	1.20	1.30	1.30	1.40	1.20	1.40	1.50	1.30	1.50	1.40
S'	0.19	0.28	0.35	0.26	0.34	0.32	0.39	0.24	0.36	0.43	0.30	0.41	0.35
m	1.37	1.39	1.40	1.49	1.50	1.61	1.62	1.64	1.73	1.74	1.77	1.86	1.91

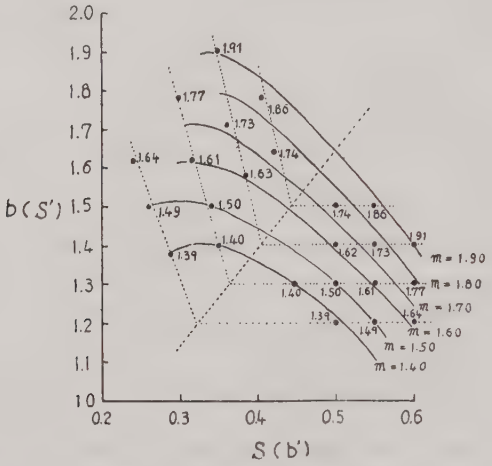


Fig. 5. Isometric line of m.

From Table 5, isometric lines of m in the various combination of $s(b')$ and $b(s')$ have been drawn in Fig. 5. This diagram would be of practical use for determining the essential factor, m, related with given values of $s(b')$ and $b(s')$ for designing a double net.

It may be worth adding here that fishing rate of double nets at sea may as well be affected by visivility of the nets, bioluminescence on them, and different resistance of meshes against current. However, as the present experiments were carried out by controlling or neglecting these factors, further experiments under uncontrolled conditions have to be performed in the future before recommending a double net to industrial use.

Acknowledgement

The author wishes to express his gratitude to Dr. M. Tauti, Professor Emeritus of the Tokyo University of Fisheries, for his guidance and revising the manuscript, and to Mr. S. Takayama for his valuable advice given in the present work. The hearty cooperation rendered by the members of the North Pacific Department of Taiyo Fishery Company for the performance of the experiments is deeply appreciated.

Furthermore, the author's thanks are due to the authorities of the Tokyo University of Fisheries for providing the experimental ponds and facilities available to him, and also he wishes to acknowledge his indebtedness to Mr. M. Inoue, Mr. A. Koike and to Mr. Z. Uematsu, the members of the University for all their helps in carrying out the experiment. He is grateful for advices given by Mr. M. Ishida of the Laboratory in regard to English expression of the paper.

Reference

V. BRANDT, A.: The efficiency of drift-nets, Jour. du Conseil **XXI** (1), 1955

水産化学及び利用

MARINE PRODUCT UTILIZATION AND CHEMISTRY

魚介肉蛋白

Muscle Proteins of Aquatic Animals

ビタミン及び栄養成分

Vitamins and Nutritive Elements

食品保蔵・加工

Food Preservation and Processing

AN ELECTROPHORETIC STUDY OF THE SQUID ACTOMYOSIN

Juichiro J. Matsumoto*

(Received Dec. 16, 1958)

As reported previously,[1,2] efforts to isolate actomyosin from squid muscle by the ordinary method for rabbit and carp actomyosins failed to be successful. By a modified procedure, a protein fraction of the squid was obtained the solution of which showed high viscosity, and intense streaming birefringence (SB) and intense opalescence. This fraction was confirmed to be an actomyosin-like protein on the basis of the facts that it showed, on the addition of adenosinetriphosphate (ATP), not only a viscosity drop followed by recovery but also superprecipitation.[3]

The present paper deals with some electrophoretic studies, performed to confirm the identity or non-identity of the squid actomyosin-like protein with actomyosins of the rabbit and carp. Some measurements were done on carp actomyosin as control.

Experimental

Materials and methods

Unless otherwise stated methods used were the same as in the previous reports.[1,2].

Materials: Both male and female carps, *Cyprinus carpio* (body weight 276～400 g.), were used in November and December. For the material, the dorsal lateral muscle was taken up immediately after killing the fish by cutting off the head.

Mantle muscle of squid, *Ommastrephes sloani pacificus* Steenstrup, including both sexes (body weight, 238～516 g.) was used. The experiments were carried out from January to July, and the squids were live or very fresh when they were brought in the laboratory.

Preparation of carp actomyosin:

To 30 g. of minced muscle, 270 m*l*. of 0.6 M KCl was added and homogenized for 1 min. by a baffle-plated Waring blendor (～10,000 r.p.m.)[4]. The mixture was centrifuged for 20 min. by 4,000 r.p.m. (～2,800 *g*). To the supernatant, S_1, 2 volumes of water was added (0.2 M KCl), the mixture being centrifuged 30 min. by 4,000 r.p.m. After washing the precipitate, P_2, two times with 0.2 M KCl, the precipitate was

* Tokai Reg. Fish. Res. Lab., Chuo-ku, Tokyo, Japan (松本重一郎, 東海区水産研究所).

Contribution B No. 306 from the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Tokyo.

Read before the Annual Meeting of the Japanese Society of Scientific Fisheries, April 2, 1958.

This investigation was supported by the grant from the Research Fund of the Ministry of Education.

brought to 0.6 M KCl by adding 2.4 M KCl solution and then subjected to dialysis.

Preparation of squid actomyosin:[1)]

The precipitate, P_2, obtained by the similar treatment with carp muscle was reprecipitated at 0.2 M KCl, and dissolved into ionic strength (I) 0.6 and dialysed. In the earlier stages of the study, the fractionation was repeated two times and the ionic strength of the last sample was brought to 0.4. However, an amount of the protein deposited occasionally when the solution was centrifuged after dialysis. Since it was suspected, that the insolubilization met with in the earlier stage of the study might be attributable to the repetition of precipitation, the reprecipitation was ommitted and the last solution was brought to 0.6 ionic strength. Although these modifications seemed to make one successful in preparing the solution for electrophoresis, it was found, in the later stage of the study, that reprecipitation does not affect the solubility, when froth formation was avoided throughout the treatments.

Dialysis:

In cellophane bag, 20~50 m*l*. protein solution was dialysed against 1 *l*. of NaCl-phosphate buffer (I=0.3+0.1=0.4, pH~7.2) at 5°C, gently revoluting the cellophane bag. Usually, the buffer solution was renewed after one night and two night dialyses respectively. After a definite period, protein solution was pipetted out and centrifuged for 20 min. by 4,000 r.p.m., the supernatant being subjected to electrophoretic analysis. The buffer solution used by Dubuisson[5)] was chosen in the present study.

Electrophoresis:

HITACHI HTB-type electrophoretic apparatus with Schlieren-diagonal system was used. The sectional area of the cell was 2×15 mm. and the conditions of electrophoresis were as follows: Electric field, 1.9~2.2 V/cm.; electric current, 12.0 mA; temperature, 1°C.; protein concentration, 2~6 mg./m*l*.; duration, 5 hr. To calculate the electrophoretic mobilities, conductivity of buffer solution was used for the ascending limb, and that of the protein solution for the descending limb.

Conductivity and pH:

A Wheatstone-bridge system conductance meter of ITO Electric Co. was used at 1°C., adopting 1 M KCl solution as standard. Value of pH was determined at 1°C., using BECKMAN G type glass electrode pH meter.

Results

(*A*) *Electrophoresis of carp actomyosin*

To test the experimental system of the author, results with carp actomyosin were compared with those appearing in literature.

The present preparation of carp actomyosin which corresponded to 43~50% of total muscle proteins was homogeneous as far as the salting-in curve suggests.[6)] As Fig. 1 shows, the electrophoretic patterns of 6 runs for 3 samples suggested their homogeneity, either after 1 night dialysis or after 2 night dialysis. As shown in

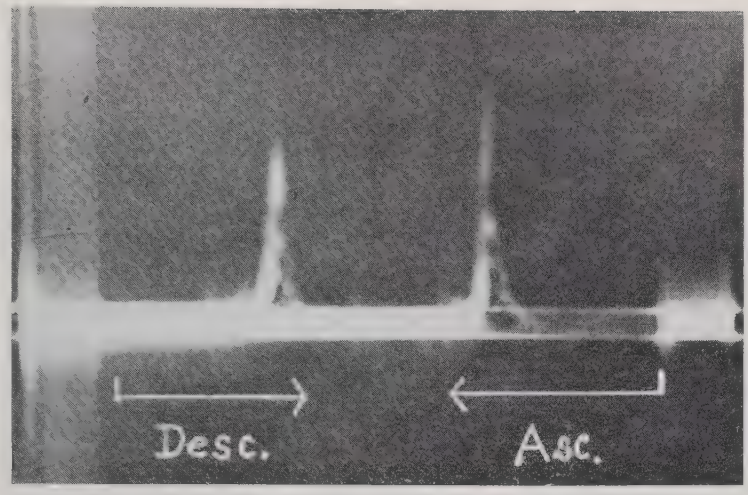


Fig. 1. Electrophoretic diagram of carp actomyosin.
18,000 sec., 2.21 V/cm., 1.5 mg. protein/m*l*.

Table 1. Electrophoretic mobilities of actomyosins of various animals

Animal	Ionic strength	pH	Mobility ($\times 10^{-5}$cm^2./V. sec.)		Note	References
			Ascending limg	Descending limb		
Carp	0.4	7.2	−3.08±0.12*	−2.63±0.11*	1 night dialysis	The present author*
	0.4	7.2	−3.10±0.07*	−2.75±0.15*	2 night dialysis	The present author*
Carp	0.35	7.1	−2.88±0.14	−2.62±0.21		HAMOIR[7]
Cod	0.4	7.4	−3.05	−2.90		CONNELL[8]
Cod	0.4	7.4	−3.30			DINGLE[9]
Frog	0.35	7.2	−3.1	−2.9		GODEAUX[10]
Rabbit	0.4	7.2	−2.7			DUBUISSON[5]
	0.4	7.3	−3.1	−2.5		DUBUISSON[11]

* Average of three runs are presented.

Table 1, the mobility was slightly higher after 2 night dialysis than after 1 night dialysis, but the figures including both cases were practically equal to those of HAMOIR with carp actomyosin[7] and found to be in the level obtained with cod,[8,9] rabbit[5,11] and frog[10] actomyosins. So the electrophoretic system of the present study was shown to be reliable.

B) A preliminary electrophoresis of squid actomyosin

The squid actomyosin preparation containing 40～60% of the total muscle proteins

was preliminarily subjected to electrophoresis after 2 night dialysis. The patterns of a few runs were essentially equal to Fig. 2, which reveals the presence of three components in almost equal amount with each other, different from carp actomyosin. On the one hand, it was suspected that incompleteness of purification might have

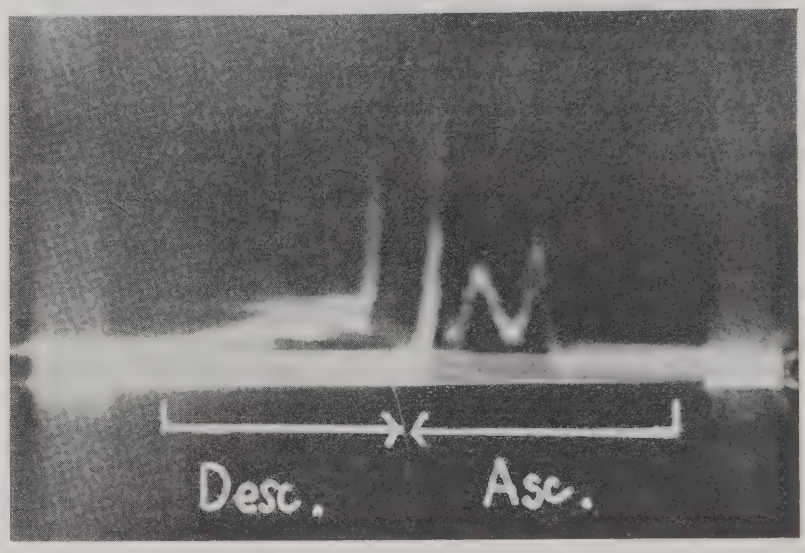


Fig. 2. Electrophoretic diagram of a squid actomyosin preparation. 18,000 sec., 2.13 V/cm., 5.5 mg. protein/m*l*.

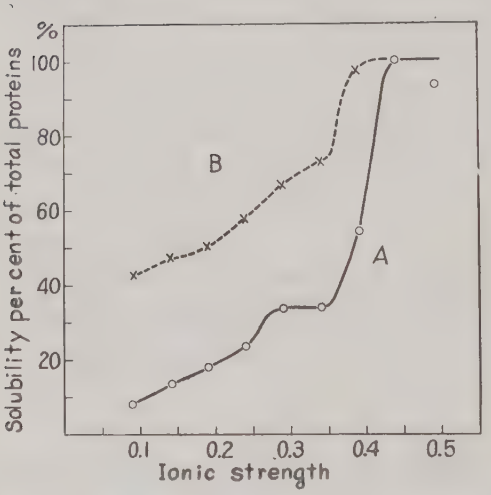


Fig. 3. Salting-in curves of a squid actomyosin preparation before and after dialysis preceding electrophoresis.
Curve A: Immediately after dissolution of the protein;
Curve B: After dialysis for 22.5 hr.
Protein concentration, 4.9 mg./m*l*.; pH, 6.7 ~6.9.

resulted in such heterogeneity, and on the other hand, the heterogeneity might be related with the instability of the squid actomyosin-like protein, as it was found previously[1,2] from the changes in solubility behaviors. Along the latter way of thinking, some change might have occurred on the actomyosin-like protein of the squid during electrophoresis. So, the salting-in curves were tested on the squid actomyosin preparation before and after 22.5 hr. dialysis against the buffer, I=0.4 and pH 7.2. As Fig. 3 shows, a protein fraction which is soluble at I=0.1 appears to have increased in amount during the dialysis. So the electrophoretic diagrams of Fig. 2 might have contained an artefact which was brought forth during the dialysis.

(C) *Electrophoresis of squid actomyosin after various duration of dialysis*

Although the above results suggested that electrophoresis will not allow to catch the intact state of the actomyosin preparation of the squid, it happened that an approach was made with success from the comparison of the electrophoretic diagrams obtained after various durations of dialysis.

If a solution dialysed a night was analysed, patterns were obtained as shown in Fig. 4, A and B. While, as seen in the figure, only 2 components were found in a run within 4 hr. a middle-speeded component was found to separate from the faster component if electrophoresis was prolonged beynd 5 hr. The resulting pattern consisted

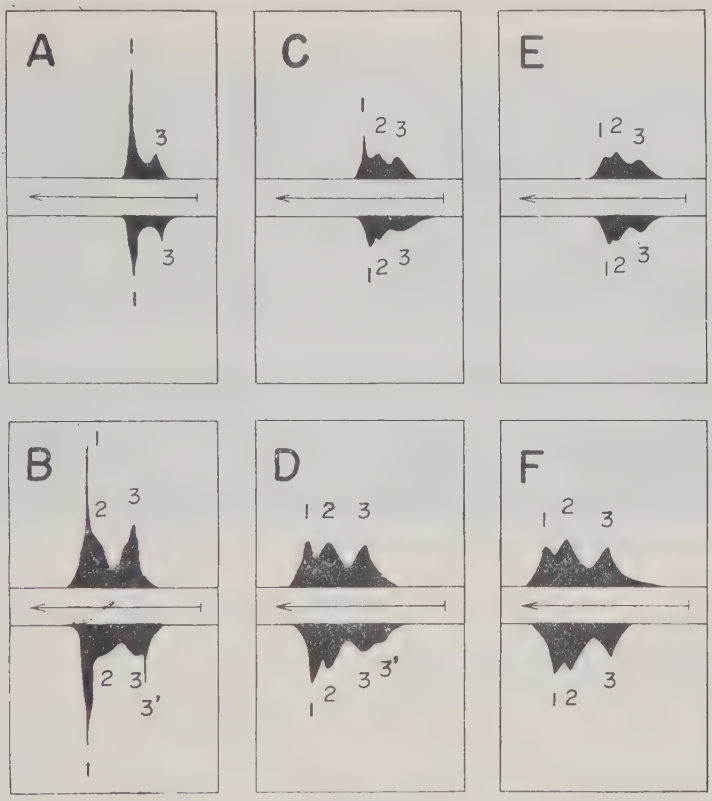


Fig. 4. Electrophoretic diagrams of a squid actomyosin preparation after dialysis of various durations.

Upper part, ascending limb; lower part, descending limb.

	Dialysis	Electrophoresis	Electric field V/cm.	Concentration mg. protein/ml.
A	15 hr.	10,800 sec.	1.96	5.4
B	15 hr.	18,000 sec.	1.96	5.4
C	41 hr.	10,800 sec.	2.11	4.4
D	41 hr.	18,180 sec.	2.11	4.4
E	64 hr.	10,800 sec.	2.09	4.9
F	64 hr.	18,180 sec.	2.09	4.9

of 3 components whose electrophoretic mobilities corresponded each to the levels of three components of Fig. 2.

If solutions dialysed two nights or five nights long were analysed, all three components were found as shown in Fig. 4, C～F. Moreover, a calculation of the relative area for the three components suggested that, during dialysis, Component 1 decreased while Component 2 increased in amount (Table 2), and it was suggested that Component 1 changed into Component 2 during dialysis.

Although, in some cases, Component 3 was found to divide into two peaks, it appeared insignificant to distinguish these two from each other.

Throughout more than 20 runs with some 10 preparations, the results were substancially the same as the above. So it appeared that the actomyosin-like preparation of the squid, immediately after isolation, contains less than three components, that is, Component 1 only or Components 1 and 3 and the greater part of it (～60%)

Table 2. Changes in the relative amount of the components of electrophoretic diagram of the squid actomyosin preparation during dialysis

Limb / Dialysis / Component	Ascending			Descending		
	15 hr.	41 hr.	64 hr.	15 hr.	41 hr.	64 hr.
1	39	21	22	} 67	34	27
2	27	38	42		32	42
3	34	41	36	33	34	31

Figures denote the relative area of each component to the total area of the electrophoretic diagram.

Table 3. Electrophoretic mobilities of the components of the squid actomyosin preparation. Average of 6 runs are presented

Component	Mobility ($\times 10^{-5}$ cm.^{2}/V. sec.)			
	1 night dialysis		2 night dialysis	
	Ascending limb	Descending limb	Ascending limb	Descending limb
1	−4.78±0.85*	−4.40±0.47*	−5.11±0.17*	−4.37±0.28*
2	−4.29±0.11	−3.74±0.25	−4.12±0.26	−3.73±0.14
3	−3.02±0.12	−3 00±0.37	−3.21±0.18	−2.97±0.37

* $\sigma=\sqrt{\frac{\Sigma(U-\bar{U})^2}{N}}$ (Standard deviation), NaCl·phosphate buffer, I=0.4, pH～7.2: temperature, 1°C.; duration of electrophoresis, 3～5 hr.; electric field, 2.07～2.26 V/cm.

is occupied by Component 1.

The electrophoretic mobility of these components is shown in tabular form (Table 3). The figures obtained after 2 night dialysis seem slightly higher in ascending limb and slightly lower in descending limb compared with those obtained after 1 night dialysis.

It appears that the variation of mobility of each component is greater than the case with carp actomyosin. The turbidity migrated with Component 1, though its intensity was different in separate preparations.

In the last stage of the study, it happened that a preparation showing a single component as Fig. 5 was obtained. This preparation was gained by two-times reprecipitation at 0.2 ionic strength succeeded by centrifugation at 12,800 *g* using a very

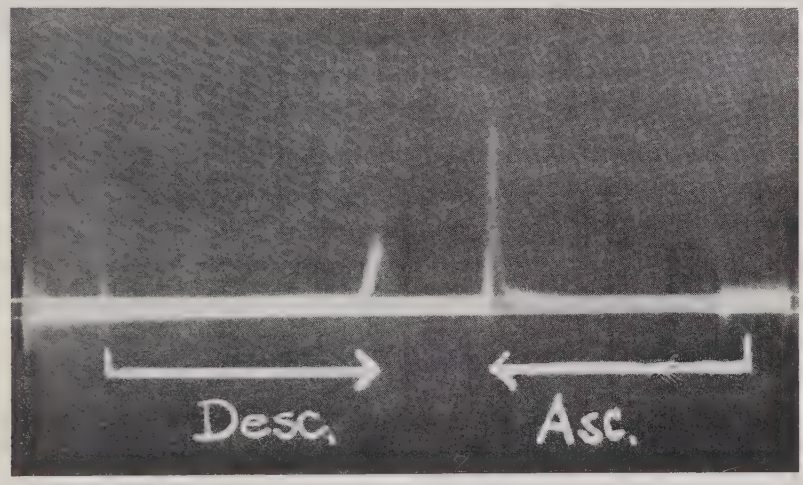


Fig. 5. Electrophoretic diagram of a squid actomyosin preparation purified by reprecipiting twice and centrifuging at 12,800 *g*.
18,000 sec.; 1.94 V/cm.; 4.39 mg. protein/m*l*.; dialysis, 17 hr.

fresh squid muscle captured in November. Since the mobility of this peak corresponded to that of Component 1, it seemed most probable that the actomyosin-like protein of squid muscle is Component 1 (Fig. 5).

Discussion

As reported previously,[2] a globulin which was isolated from squid muscle was found to be an actomyosin or an actomyosin-like protein basing on its viscosity, streaming birefringence, responses of viscosity to ATP. Moreover, marked superprecipitation was observed with this preparation.[3] However, the present results show that the squid actomyosin preparation behaves electrophoretically in a considerably different way compared with actomyosins of rabbit and carp: Firstly, the actomyosin-like protein of the squid migrated faster than others as Tables 1 and 3 show. Secondly,

it was usually accompanied with one or two impurities, while an electrophoretically homogeneous actomyosin was readily obtained in the case of the rabbit or carp muscle.

As regards the nature of Component 2, it is most probable that it was given rise to from Component 1 as a result of degradation or denaturation. Moreover, it is thought that Component 2 might be tropomyosin from the following reasons:

i) The results of the previous reports[1,2] suggest that the component which is formed during storage of the solution of the actomyosin-like protein of the squid might be less viscous, might have no or, if any, low ATP-sensitivity, and might be less precipitable at lower ionic strengths.

ii) When salt-extract of the squid muscle was stored cold for 1~2 nights and then diluted to I=0.05, the amount of precipitating myosins* was smaller than the amount obtained by diluting immediately after extraction. In the former cases, the precipitate increased markedly when the pH was brought to 6.5 while it was scanty at pH beyond 7.[12]

iii) When actomyosin preparation of the squid was kept cold for a night at I= 1.0, pH~10, no SB was found even after the solution had been brought to neutrality. When the solution was lead to an ionic strength of 0.1 and pH 7 by dialysis, a fine suspension with silky lustre was formed besides the solution showed an intense SB.[13] These properties are reminiscent of tropomyosin.

Table 4. Electrophoretic mobilities of tropomyosin of various animals

Animal	Ionic strength	pH	Mobility ($\times 10^{-5}$ cm.^{2}/V. sec.)		Reference
			Ascending limb	Descending limb	
Rabbit	0.35	7.3	−5.6	−4.9	DUBUISSON[14]
Carp	0.35	7.1	−4.30	−3.90	HAMOIR[15]
Haddock	0.35	7.1		−4.90	KUBO[16]
Venus (adducter)	0.4	7.0	−2.9	−2.7	KOMINZ *et al.*[17]
Squid	0.35	7.0 7.4	−3.13 −4.10	−3.42 −3.65	YOSHIMURA[18]
Component 2 of squid actomyosin	0.4	7.2	−4.12	−3.73	Present author

iv) When the electrophoretic mobilities of Component 2 are compared with those of squid tropomyosin,[18] the former appears to be higher than the latter (Table 4). However, the former are rather close to tropomyosins of the carp[15] and the haddock[16] and slightly lower than rabbit tropomyosin.[14]

* A globulin fraction which is precipitated by dilution of salt-extracts was called "myosins" as to include myosin, actomyosin and co-precipitable proteins.

If there are two kinds of tropomyosin, tropomyosin A with lower mobility and tropomyosin B with higher mobility according to the notation of KOMINZ *et al.*,[17], Component 2 might belong to tropomyosin B as rabbit, carp and haddock tropomyosins do, while *Venus* tropomyosin shown in Table 4 belongs to tropomyosin A. Though content of tropomyosin of the squid was as low as 0.38% of fresh muscle, that of Component 2 might be higher (3%). The difference in yield between the two cases may make one suspect the identy of YOSHIMURA's tropomyosin[18] to Component 2.

However, it was stated by BAILEY and other workers[17,19-22] that tropomyosin can be isolated in high yield (25~30% of the total muscle proteins) from muscles of *Pinna* and other mollusks, and that tropomyosin is a dominant protein of molluscan muscle. Very recently, YOSHIMURA *et al.*[23] isolated by a similar way from the dehydrated squid myofibril a cystalline tropomyosin with a good yield corresponding to a greater part of the myofibrillar proteins.

It is inferred from the experimental bases of the present paper that a dominant protein, which is isolated as an actomyosin-like complex protein[1,2] from squid muscle, gives rise to an artefact which is alike to tropomyosin. The isolation methods of BAILEY[19-21]* and LAKI[22] include treatment at high ionic strength for some period[19][20][21] or treatment with KI solution[22], both of which should promote the degradation of the actomyosin-like protein of the squid. Therefore, one might think of the secondary formation of tropomyosin during isolation procedures, e.g. dialysis for long duration, from an actomyosin-like complex protein, if it might have been functioning as a contractile element in situ and isolated once in vitro. A tropomyosin, which neither has ATPase activity nor shows ATP-response of viscosity, might not carry by itself the contractile function.

Concerning other molluscan muscles, actomyosin-like proteins were isolated in terms of myosin B from *Pecten* and other shellfishes by YAGI[24] and TONOMURA *et al.*[25]. So, some actomyosin-like proteins might exist in molluscan muscles. As pointed out by KOMINZ *et al.*[17] it might be due to the lability of these actomyosin-like proteins of Molluscs that tropomyosins which were contained as a sub-unit were readily isolated from the molluscan muscles.[17,19-22]

On the other hand, RÜEGG[29] has brought forth another explanation of the abundance of tropomyosin in *Pinna* adductor: Tropomyosin molecules exist in a polymerized form, which is connected with viscous tonus in situ, besides actomyosin plays a role of the contractile element. However, as far as the squid proteins studied by the present author are concerned, tropomyosin appears to come from the actomyosin-like protein because the falls in viscosity and in ATP-sensitivity of the actomyosin preparation[2] parallel the changes as well in solubility behaviors[1] as in electrophoretic properties.

If it is reflected that the squid mantle is composed of the smooth muscles, it

* Wet method cited in the reports.

might be interesting that a contractile protein isolated from the uterus smooth muscle has some similarity to the squid protein. The uterus protein which was referred to as actotropomyosin by Snellman *et al.*[30] showed an electrophoretic pattern consisting of three peaks, $-7.7\times$, $-4\times$ and -2.8×10^{-5} cm²./V. sec. In viscometric study,[30-33] the uterus protein was found to respond to ATP, its contractile function in situ being suggested.

In either hypothesis of Kominz *et al.*[17] or of Snellman,[30] actin should be found after the complex protein was decomposed. Nevertheless, none of three electrophoretic components of the squid actomyosin preparation can not be identified as actin according to the present interpretation. Further informations are needed before proposing a conclusion.

Further study on the relationship of the actomyosin-like protein and tropomyosin of molluscan muscles will be of significance in the comparative biochemistry of muscle contraction.

Summary

1) The actomyosin preparation isolated from the squid mantle muscle was subjected to electrophoresis at an ionic strength of 0.4 and pH 7.2 (NaCl-phosphate buffer), three components with the mobilities, $-5.1\times$, $-4.1\times$, and $-3.2\times$ (ascending limb), $-4.4\times$, $-3.7\times$, and -3.0×10^{-5} cm²./V. sec. (descending limb), respectively, being observed usually. It appeared a characteristic of the squid actomyosin-like protein that the electrophoretic homogeneity is less readily attained by isolating procedure, while actomyosins of the rabbit and carp readily give a single pattern. However, in few examples of the squid, preparations showing a single peak of the fastest were obtained.

2) By comparing the electrophoretic patterns of different samples obtained after different periods of dialysis, and results of various experiments, a tentative interpretation was presented as follows:

Component 1, the fastest, is the actomyosin-like protein of the squid muscle, which shows high viscosity and its ATP-response. The actomyosin-like protein of the squid is higher in mobility than the ones of rabbit and carp actomyosins.

Component 2, the middle-speeded, is an artefact which is derived from Component 1 during dialysis and electrophoresis. Component 2 might correspond to tropomyosin.

With the nature of Component 3, the slowest, no reasonable explanation is obtained.

The author wishes to express his gratitude to Dr. M. Migita for his invaluable advice, to Prof. S. Mizushima, and to Prof. T. Ando for their encouragement and to

Miss E. Okuyama for her technical assistance. The author is indebted to Prof. S. Ui, Dr. H. Hirai and Dr. G. Hamoir for their kindness in giving advices in electrophoretical technique.

References

1) Matsumoto, J. J.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **24**, 125–132 (1958).
2) Mattumoto, J. J.: *Ibid.*, **24**, 355–362 (1958).
3) Matsumoto, J. J.: Unpublished data.
4) Migita, M. and Matsumoto, J. J.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **22**, 561–568 (1957).
5) Dubuisson, M.: *Experientia*, **2**, 258–259 (1946).
6) Matsumoto, J. J.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **24**, 29–36 (1958).
7) Hamoir, G.: *Arch. intern. physiol. et biochim.*, **63**, suppl. (1955).
8) Connell, J. J.: *Biochem. J.*, **58**, 360–367 (1954).
9) Dingle, J. R.: *J. Fish Res. Bd. Canada*, **15**, 135–153 (1958).
10) Godeaux, J.: *Bull. Acad. Roy. Belgique, Cl. Sciences*, **38**, 1163–1181 (1952).
11) Dubuisson, M.: *Biol. Rev.*, **25**, 46 (1950).
12) Migita, M., Matsumoto, J. J., Aoe, N. and Saishu, T.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **24**, 51–58 (1959).
13) Matsumoto, J. J.: Unpublished data.
14) Dubuisson, M.: *Experientia*, **6**, 269-271 (1950).
15) Hamoir, G.: *Biochem. J.*, **48**, 146–151 (1951).
16) Kubo, S.: *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **8**, 147–157 (1957).
17) Kominz, D. R., Saad, F. and Laki, K.: *Medical Sci.*, **9**, 118–128 (1958).
18) Yoshimura, K.: *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **3**, 159-176 (1955).
19) Bailey, K.: *Publ. Staz. Zool. Napoli*, **29**, 96–108 (1956).
20) Bailey, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 612-619 (1957).
21) Hanson, J., Lowy, J., Huxley, H. E., Bailey, K., Kay, C. E. and Rüegg, J. C.: *Nature*, **180**, 1134–1135 (1957).
22) Laki, K.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **67**, 240–242 (1957).
23) Yoshimura, K. and Kubo, S.: Published at the Meeting of the Japanese Society of Scientific Fisheries, Oct. 13, 1958.
24) Yagi, K., Sasaki, T. and Matsumiya, H.: *J. Jap. Biochem. Soc.*, **26**, 630–633 (1954).
25) Tonomura, Y., Yagi, K. and Matsumiya, H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **59**, 76–89 (1955).
26) Tonomura, Y., Yagi, K. and Matsumiya, H.: *Ibid.* **64**, 466–479 (1956).
27) Yagi, K.: *J. Biochem. (Japan)*, **44**, 337–346 (1957).
28) Matsumiya, H., Morita, F., Kitagawa, S., Yagi, K. and Tonomura, Y.: *Ibid.*, **44**, 347–357 (1957).
29) Rüegg, J. C.: *Biochem. J.*, **69**, 46p (1958).
30) Sneliman, O. and Tenow, M.: *Biochem. Biophys. Acta*, **13**, 199-208 (1954).
31) Csapó, A.: *Nature*, **164**, 702-703 (1949).
32) Csapó, A.: *Acta Physiol. Scand.*, **19**, 100-114 (1949).
33) Needham, D. M. and Dawkwell, J. M.: *Biochem. J.*, **63**, 337-344 (1956).

IDENTITY OF M-ACTOMYOSIN FROM AQUEOUS EXTRATC OF THE SQUID MUSCLE WITH THE ACTOMYOSIN-LIKE PROTEIN FROM SALT EXTRACT

Juichiro J. Matsumoto

日本水産学会誌

第二十五巻 第一号 別冊

昭和三十四年五月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of

the Japanese Society of Scientific Fisheries

Vol. 25, No. 1, May, 1959.

IDENTITY OF M-ACTOMYOSIN FROM AQUEOUS EXTRACT OF THE SQUID MUSCLE WITH THE ACTOMYOSIN-LIKE PROTEIN FROM SALT EXTRACT

Juichiro J. Matsumoto*

(Received Dec. 16, 1958)

As reported previously, an actomyosin-like protein which shows ATP-response of viscosity and streaming birefringence (SB) was isolated from aqueous extracts of the squid mantle muscle, and it was proposed by the present author to refer to it as M-actomyosin.[1)-5)] While this protein fraction was isolated from aqueous extract, also an actomyosin-like protein fraction was obtained from salt-extract of the squid mantle muscle with yield as much as 40～85% of total muscle proteins.[6),7)] Since it was inferred that the latter actomyosin-like protein might be the dominant contractile protein of the squid muscle[8)], it was questioned whether these two actomyosin-like proteins are identical with each other or not.

In the present report, results of electrophoretic analysis and other experiments designed to answer this question are described.

Experimental

Materials and methods

Unless otherwise stated methods employed are the same as in the previous reports[1),3),6)].

Materials: Both male and female of the squid, *Ommastrephes sloani pacificus* Steenstrup (body weight 200～485 g.) captured from March to June were used.

Preparation: To 40 g. of the minced squid muscle 280 m*l*. of distilled water was added and the mixture was homogenized for 1 min. with a baffle-plated waring blendor[9)] and centrifuged 20 min. by 4,000 r.p.m. (～2,600 *g*). The precipitated residue was homogenized with 200 m*l*. of water, centrifuged, and then the residue was mixed with 750 m*l*. of water, the third aqueous extract, S_3, being obtained after centrifugation. The second and the third extracts showed marked SB, while the first none. To the third extract, S_3, solid NaCl was added into 0.2 M salt concentration, then the mixture was centrifuged for 30 min. by 2,600 *g*. The resultant precipitate was, by adding 2.4 M NaCl, dissolved into 0.6 M NaCl solution which was highly viscous and strongly streaming birefringent.

* Tokai Reg. Fish. Res. Lab., Chuo-ku, Tokyo Japan (松本重一郎, 東海区水産研究所).
Contribution B No. 307 from the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Tokyo.
Read before the meeting of the Japanese Society of Scientific Fisheries, on October 13, 1958.

Dialysis and electrophoresis: The same methods were used as described in the preceding paper[10]. Conditions of electrophoresis are the following: Buffer solution, I=0.4 and pH 7.2[11]; electric field, 1.9~2.2 V/cm.; electric current, 12.0 mA; temperature, 1°C.; protein concentration 3~5 mg./m*l*.; duration of electrophoresis, 5 hr.

Results

(*A*) *Electrophoresis of the M-actomyosin preparation*

In few cases among several analyses, only 2 peaks were observed after 1 night dialysis (Fig. 1, Fig. 2 A and B), while a middle-speeded peak was usually found to appear when the same sample was analysed after 2 night dialysis (Fig. 2, C and D).

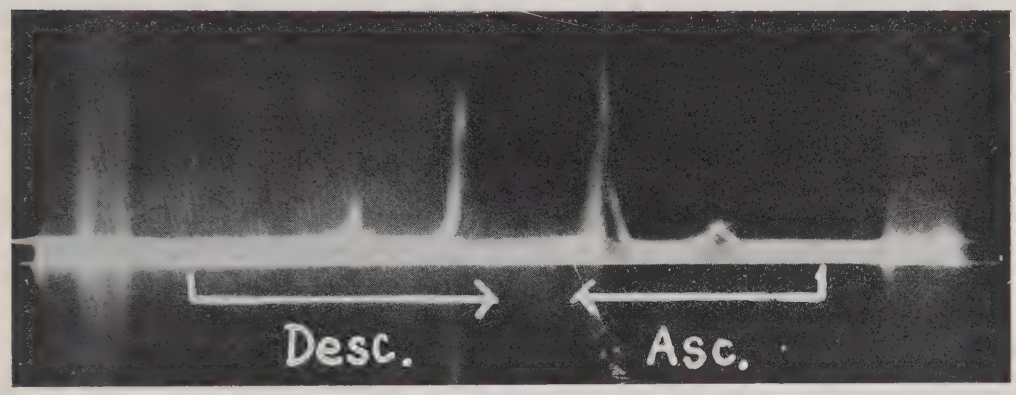


Fig. 1. Electrophoretic diagram of M-actomyosin obtained from aqueous extract of squid muscle. For experimental conditions see Fig. 2-B.

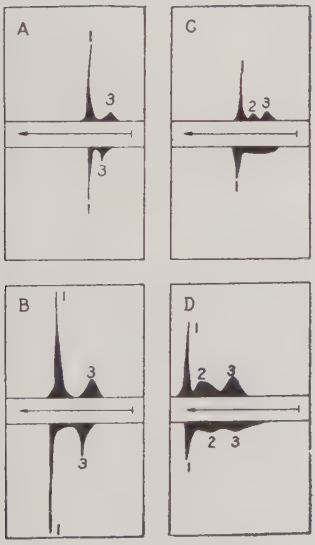


Fig. 2. Electrophoretic diagrams of M-actomyosin obtained from aqueous extract of squid, after dialysis of different durations. Upper part, ascending limb; lower part, descending limb.

	Dialysis	Electrophoresis	Electric field V/cm.	Concentration mg. protein/m*l*.
A	18 hr.	10,800 sec.	1.93	7.0
B	18 hr.	18.000 sec.	1.93	7.0
C	42 hr.	10,800 sec.	2.15	6.8
C	42 hr.	18,000 sec.	2.15	6.8

These results are similar to those obtained usually with the actomyosin-like protein from salt extract of the squid which was reported in the preceding work,[10] although, in the latter case, a small peak of Component 2, the middle-speeded, was often observed after dialysis as short as 1 night, and, on the other hand, diagrams lacking in both Components 2 and 3 have been obtained in few examples of the preceding work.

Whereas long dialysis beyond 2 night was omitted in the present study, an electrophoretic pattern which was obtained from an unfresh squid muscle, though not yet spoiled, was reminiscent of the patterns given after long dialysis of the protein from salt extract[10] (Fig. 3).

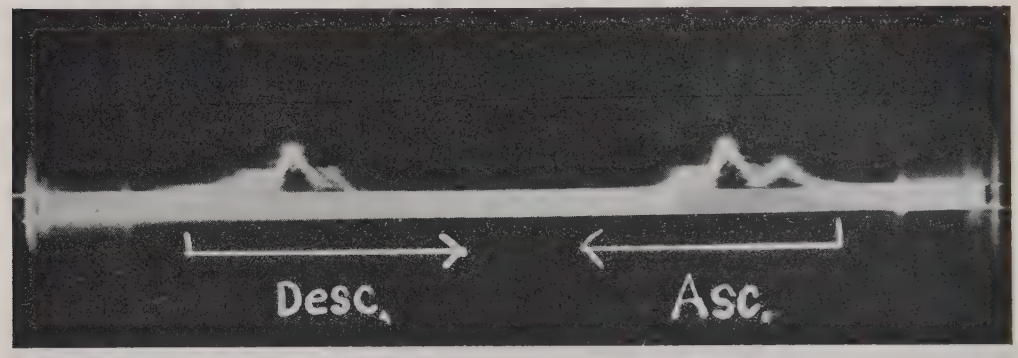


Fig. 3. Electrophoretic diagram of an M-actomyosin preparation obtained from an unfresh squid muscle. 10,800 sec.; 2.06 V/cm.; 3.2 mg. protein/m*l*.; dialysed 16 hr.

These results suggest that, in the M-actomyosin preparation, two components, Component 1 and Component 3, might be contained from in the intact state, while Component 2 might be formed as a result of degradation or denaturation of any or both of other components.

The electrophoretic mobility are listed in Table 1 wherein figures of the preceding paper[10] are presented for reference. The values for three components in ascending limb are close with each other, while those in descending limb appear slightly

Table 1. Electrophoretic mobility of the components of M-actomyosin of the squid obtained from aqueous extracts of the squid muscle
(Values after 2 night dialysis are presented)

Limb	Component	M-actomyosin from aqueous extract	Actomyosin-like protein from salt extract of the squid
Ascending	1	$-5.06\pm0.40\times10^{-5}$cm^2./V. sec.	$-5.11\pm0.17\times10^{-5}$cm^2./V. sec.
	2	$-4.29\pm0.42\times$ 〃	$-4.12\pm0.26\times$ 〃
	3	$-3.45\pm0.28\times$ 〃	$-3.21\pm0.18\times$ 〃
Descending	1	$-5.13\pm0.15\times$ 〃	$-4.37\pm0.28\times$ 〃
	2	$-4.37\pm0.06\times$ 〃	$-3.73\pm0.14\times$ 〃
	3	$-3.23\pm0.05\times$ 〃	$-2.97\pm0.37\times$ 〃

higher in M-actomyosin from aqueous extracts. However, if it was taken account of that the measurement of mobility is not free from ambiguity as a result of meniscus formation in such a viscous fluid, every component of both of two preparations may be practically identical with each other.

The change of the salting-in curve of the M-actomyosin preparation before and after dialysis was found as the case with the actomyosin-like protein from salt extract, but its presentation will be omitted.

Similar patterns were obtained also with the M-actomyosin preparations from another species of the squid, *Loligo bleekeri* KEFERSTEIN.

(*B*) *Dissolution of the actomyosin-like protein of the squid in water*

If the actomyosin-like protein from aqueous extracts of the squid muscle might be identical with the actomyosin-like protein from salt extract, it might happen that the latter is soluble in water. So a precipitate at 0.2 ionic strength of the actomyosin-like protein from salt extract was repeatedly subjected to extraction with water, a similar experiment with carp actomyosin precipitate being done as a control (Table 2). The ionic strength of the extract was calculated from conductivity.

As shown in the table, it was found that a considerable amount of the squid protein began to dissolve in water at the third extraction, and as much as 86% of the total amount of the used protein moved into solution with repeated extractions, a total of seven times, as far as the proteins which escaped from depositing on centrifugation for 20 min. at 4,000 r.p.m. ($\sim$2,600 *g*) was regarded as the "dissolved". In parallel to the increase in the dissolved protein, it was found that marked SB

Table 2. Solubility in water of actomyosin-like protein of the squid from salt extract and of actomoysin of the carp on repeated extractions

Preparation	Actomyosin-like protein of squid					Actomyosin of carp				
Yield*	40%					36%				
Extract	Protein concn.	Yield**	SB	pH	*I***	Protein concn.	Yield**	SB	pH	*I***
S_1	0.14	3.7	−	6.3	8.4×10^{-2}	0.07	2.8	−	7.1	2.4×10^{-2}
S_2	0.12	2.9	−	6.5	2.9×10^{-2}	0.19	8.3	−	7.0	5.5×10^{-3}
S_3	0.45	9.9	+	6.6	1.1×10^{-2}	0.34	12.3	−	7.0	1.2×10^{-3}
S_4	0.96	34.8	+	6.8	4.8×10^{-3}	0.42	16.3	−	7.4	4.7×10^{-4}
S_5	0.59	18.5	+	6.7	1.6×10^{-3}	0.22	9.8	−	6.5	2.6×10^{-4}
S_6	0.32	10.9	+	7.0	4.3×10^{-4}	0.11	5.1	−	6.7	2.1×10^{-4}
S_7	0.17	4.8	±	6.0	0.9×10^{-4}					
Total dissolved	—	85.5					54.6			
Residual	—	14.5					45.4			

* Yield of the preparation per cent of total muscle proteins.

** Yield of the dissolved protein per cent of protein subjected to repeated extractions.

*** Ionic strength.

was found in the extracts from the third to the last.

On the contrary, an actomyosin preparation of carp failed to give streaming birefringent aqueous extracts, though, against expectation, as much as 55% of the used protein was dissolved in water.

Although carp actomyosin was dissolved in a considerable amount, the actomyosin-like protein from the squid salt extract was found to be more soluble in water. That its solutions in water show SB appears a characteristic of the squid protein.

Discussion

With a view of testing the mutual identity of the actomyosin-like protein from aqueous extracts of the squid muscle and the one from salt extract, some studies were performed with results in favour of the identity of these two protein fractions.

In electrophoretic study, little differences remain. Firstly, Component 2 was smaller in the protein preparation from the aqueous extracts, but this difference will not be so significant since Component 2 might have come from the others during treatment as it was stated in the previous report[10] and confirmed in the present study (Fig. 2).

Secondly, with the actomyosin-like protein from salt extract in the preceding paper, homogeneous preparations free from Components 2 and 3 were obtained in few cases. Nevertheless, the difference in this point appears insignificant, because the greater part of the analysis in the preceding study resulted in diagrams with three components.

These results might suggest that the protein which corresponds to Component 3 is closely connected with Component 1, which might be responsible for ATP-response of viscosity and for superprecipitation.

As regards the solubility in water, it was found that the solubility is raised at the extracts with reduced ionic strengths as shown in Table 2. This relationship is similar to the data that the streaming birefringent protein in aqueous extracts of the squid muscle is deposited when the ionic strength is brought to between 0.002～0.1.[1]

Although there are some points left undissolved, it might be proved that M-actomyosin, an actomyosin-like protein of the squid muscle which has been remarkable in showing streaming birefringence in aqueous solution, is identical with the actomyosin-like protein obtained from salt extract of the squid muscle. So it will be proposed that the actomyosin-like protein, which occupies the dominant part of the squid muscle proteins, should be referred to as "M-actomyosin", no matter whether it is isolated from salt extract or from aqueous extract. This protein, whether in situ or in vitro, readily goes into aqueous solution and shows marked SB, when it is washed repeatedly with water.

Summary

1) Some electrophoretic study was made on M-actomyosin, an actomyosin-like protein obtained from aqueous extract of the squid muscle. The actomyosin-like preparation showed an electrophoretic diagram including two or three peaks, which is similar to that of the actomyosin-like protein from salt extract of the squid muscle. Also in respect of the electrophoretic mobility each component corresponded with each other in both cases. So the two actomyosin-like protein, the one from aqueous extract and another from salt extract of the squid muscle, including the accompanying proteins, were found to be identical. There was found an indication that Component 2, the middle-speeded is rather scanty in the case with the protein from aqueous extract.

2) When a precipitate of the actomyosin-like protein from salt-extract was extracted repeatedly with water, a better part of the protein moved into solution. Moreover, marked streaming birefringence (SB) was found in the extracts as the case with the repeated aqueous extraction of the squid muscle. On the contrary, SB was never found in the case with carp actomyosin, whereas nearly half of the used actomyosin of the carp was brought in solution.

3) From these experimental bases, it was proposed that the actomyosin-like protein which occupies the dominant part of the squid muscle proteins should be referred to as "M-actomyosin" no matter whether it is isolated from salt extract or from aqueous extract.

The author wishes to express his gratitude to Dr. M. Migita for his invaluable advice, to Prof. S. Mizushima and Prof. T. Ando for encouragement, and to Miss E. Okuyama for her technical assistance. Acknowledgements are due to Prof. S. Ui, to Dr. H. Hirai and to Dr. G. Hamoir for advising in electrophoretical practice.

References

1) Matsumoto, J. J.: *Bull. Tokai Regional Fish. Res. Lab.*, **20**, 65–75 (1958).
2) Matsumoto, J. J.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **23**, 47–52 (1957).
3) Matsumoto, J. J.: *Ibid.*, **23**, 92–104 (1957).
4) Matsumoto, J. J.: *Ibid.*, **23**, 775–781 (1958).
5) Matsumoto, J. J.: *Ibid.*, **24**, 29–36 (1958).
6) Matsumoto, J. J.: *Ibid.*, **24**, 125–132 (1958).
7) Matsumoto, J. J.: *Ibid.*, **24**, 135–139 (1958).
8) Matsumoto, J. J.: *Ibid.*, **24**, 355–362 (1958).
9) Migita, M. and Matsumoto, J. J.: *Ibid.*, **22**, 561–8 (1957).
10) Matsumoto, J. J.: *Ibid.*, **25**, 27–37 (1959).
11) Dubuisson, M.: *Experimentia*, **2**, 258–259 (1946).

魚肉アクトミオシンの粘度に関する研究—I

アクトミオシンの粘度測定に関する基礎的問題

石田正男・鈴木たね子

(1958 年 1 月 12 日受理)

STUDIES ON THE VISCOSITY OF FISH ACTOMYOSINS—I. SOME FUNDAMENTAL PROBLEMS ON THE VISCOSITY OF ACTOMYOSIN

Masao MIGITA and Taneko SUZUKI*

Some fundamental problems concerning the viscosity of actomyosin were studied by using a tilting viscometer (Fig. 1) designed by WADA[3], in which control of velocity gradient of the flow can be readily practiced simply by changing the position on the supporting plate to which the curved end of the viscometer is fixed. Relative viscosity η_r and velocity gradient $\bar{\beta}$ are calculated from equations (1) and (2) respectively, where t_0 and t_s are efflux times of solvent and solution, respectively. V and R in equation (2) are the efflux volume and the radius of the capillary, respectively.

Viscosity of carp actomyosin solution prepared according to Table 1 was measured at varying velocity gradients ($\bar{\beta}$) and concentrations (c). Some one hour was required for the whole measurement, but the solution proved to be stable at least for one hour at 10°C. (Table 2) and 20°C.

Apparent decrease in viscosity was observed with increasing velocity gradient (Fig. 2), as already reported by many workers with rabbit[1,2] and carp[6] actomyosins. At quite a low velocity gradient ($\bar{\beta} < 100\,\mathrm{sec}^{-1}$), however, η_r showed a fixed value independent of $\bar{\beta}$ at any concentration studied (0.03～0.25%) as illustrated in Fig. 2. This is not concordant with the result obtained by HAMOIR who measured viscosity of carp actomyosin under varying pressures form 0 to 15 cm. of water by means of a capillary tube equipped with an air reservoir. On the other hand, the same results as ours have been obtained with nitrocellulose in butyl acetate and polystyrene in toluene as well as tobacco mosaic virus in water[7]. The reason of the disagreement between the result of HAMOIR and ours is obscure.

Intrinsic viscosity $[\eta]$ of carp actomyosin was determined from η_{sp}/c or $\ln \eta_r/c$ by extrapolating both c and $\bar{\beta}$ to zero and was found to be 2.0～6.0 (Fig. 3). Measuring temperature seemed to exert an influence hardly or but slightly, if any, on intrinsic viscosity of carp actomyosin; $[\eta] = 2.5$ at 5°C., and 2.2 at 20°C. were obtained with one and the same preparation (Fig. 5).

Viscosity number $Z_\eta = (2.3 \log \eta_r)/c$ is often conveniently used as a substitute of intrinsic viscosity. Since, however, in carp actomyosin no linearity was found except one out of a dozen cases in the relationship between $\ln \eta_r$ and c at least within our experimental conditions (Fig. 4), viscosity number cannot be a characteristic quantity independent of experimental conditions. Similarly in carp actomyosin at least within our experimental conditions, ATP-sensitivity, $\frac{Z_\eta - Z_{\eta\mathrm{ATP}}}{Z_{\eta\mathrm{ATP}}}$, proposed by PORTZEHL et al cannot be taken significant in characterizing an actomyosin preparation, independently of experimental conditions.

The initial slope of the curve $(\eta_{sp}/c)_{c\to 0} \sim \bar{\beta}$ or $(\ln \eta_r/c)_{c\to 0} \sim \bar{\beta}$ affords a rough measure

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab.)

東海区水産研究所業績 B 第 308 号

of the readiness with which the molecules are orientated, that is the shape of the molecule; and the initial slope of the curve $(\eta_{sp}/c)_{\bar{\beta}\to 0} \sim c$ or $(\ln \eta_r/c)_{\bar{\beta}\to 0} \sim c$ offers some knowledge about the extent of intermolecular interaction (cf. Fig. 6).

蛋白のような高分子物質においては，分子の形がその性質をきめる大きな要素となつており，蛋白の変性には分子の変形を伴うことが多い。従つて分子の形を知ることは蛋白の研究における最も重要な手段の一つといえる。

分子の形を比較的簡単に知る方法として粘度の測定がある。粘度は毛細管式粘度計（オストワルドピペットによつて測定されることが多いが，そのさい大きな問題が2つある。第1は試料溶液の濃度によつて粘度の変ること，第2に糸状分子の溶液では更に流速によつても粘度の変ることである。球状またはこれに近い分子の溶液，所謂ニュートン流体では粘度は流速に関係なく，ただ濃度のみに関係する。従つて濃度を0に外挿した時の粘度をもつて，その分子の粘度を代表させることができる。しかしアクトミオシンのような糸状の分子ではその溶液は濃度ばかりでなく流速によつてもそれぞれ異つた粘度を示す。従つてこの点に考慮を払うことなく従来のオストワルドピペットを用いて漫然として出された測定値には普遍性がない。流速の影響を消すためには次の2つの方法がある。(i) 流速を充分大きくして流れの方向に粒子を完全に配向させるか，(ii) 低い流速のところで測定した値を流速0のところに外挿する。アクトミン及びミオシンについて MOMMAERTS[1] や PORTZEHL[2] のとつた方法は (i) によるもので，平均速度勾配 $(\bar{\beta}) > 2000\ \mathrm{sec}^{-1}$ のところで濃度 (c) をかえて，粘度を測定し，ニュートン流体の場合と同様な方法で固有粘度 $[\eta]$ を求める。即ち

$$[\eta] = \lim_{c\to 0}\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{\bar{\beta}>2000} = \lim_{c\to 0}\left(\frac{\ln \eta_r}{c}\right)_{\bar{\beta}>2000}, \qquad \eta_{sp} = \eta_r - 1$$

しかし普通のオストワルドピペットで得られる流速は一般にわれわれが実験に使用する蛋白濃度ではせいぜい $\bar{\beta} = 600\ \mathrm{sec}^{-1}$ であつて，$2000\ \mathrm{sec}^{-1}$ 以上の速度勾配を得るには特に加圧装置を必要とする。但し，同一のオストワルドピペットを用いても濃度がちがえば $\bar{\beta}$ が違うから同じ $\bar{\beta}$ のところの値をはかることは出来ない。

われわれは (ii) にあげた速度勾配を0に外挿し，流速の影響を去る方法をしらべ，和田式傾斜型粘度計[3]を用いることにより比較的簡単にこの目的を達しうることを知つたので，コイのアクトミオシン溶液について，粘度測定に関する基礎条件の吟味を行つた。本報ではこのうち η_r（相対粘度）の $\bar{\beta}$ 依存性，$\eta_{sp}/c \sim c$ 及び $\ln \eta_r/c \sim c$ 曲線の吟味，固有粘度の求め方について検討し，また粘度数の問題，測定温度の影響についてのべる。

実 験 方 法

1. 粘度の測定

傾斜型粘度計‥‥従来のオストワルド粘度計は落差が一定であるから同一濃度の溶液について各種の速度勾配に対応する粘度を求めることは出来ない。傾斜型粘度計はオストワルド型の粘度計に一定の傾斜を与えることによつて流速を変化させることが出来るようにしたものである (Fig. 1)。粘度計に一定の傾斜を与えるには，四分円型の金属板（角度計）の周りに沿つてつけてあるかけ釘に粘度計の下端彎曲部をかけ，鉛のおもりで粘度計をその位置に固定する。

測定のしかた‥‥角度板を恒温槽の中にすえつけ，粘度計に試料蛋白のうすい溶液 5cc を入れ，粘度計の傾斜をいろいろにかえてそれぞれの流出時間をよみとる。次に蛋白溶液の代り

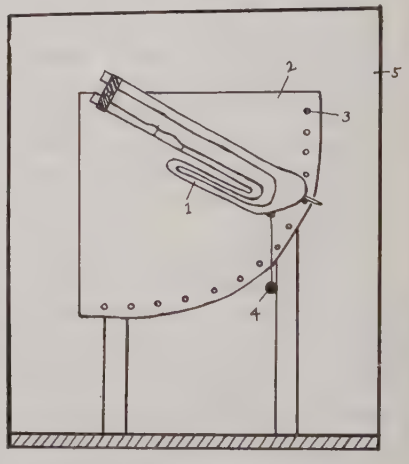


Fig. 1. Tilting viscometer
1…Pipette　4…Weight
2…Supporting plate　5…Thermostat
3…Hanger

に溶媒 (0.6M KCl 溶液) を用いて全く同じことをくりかえし，流出時間をよむ。ある速度勾配における相対粘度 η_r 及びその時の平均速度勾配 $\bar{\beta}$ はそれぞれ (1) 式及び (2) 式によつて求められる。

$$\eta_r = \frac{4/t_0}{3/t_s + t_0/t_s^2} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)^*$$

但し　t_s: 溶液の流出時間

t_0: 溶媒の流出時間

$$\bar{\beta} = \frac{4V}{\pi R^3 t} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (2)^{3)**}$$

V は t 時間中の流量，R は毛管の半径であつて，それらの値は各ピペットに示されている。同一粘度計を用いれば，R 及び V は一定であるから，$\bar{\beta}$ をきめるのは t である。故に，粘度計をかける角度板の番号を適当に選び，傾斜を変えることによつて t を変え，希望に近い速度勾配を得ることが出来る。

2. 実験材料

常時生きている材料が手に入りやすいという点で，コイを選んだ。

3. アクトミオシンの抽出

水槽中で安静状態に保つたコイを水からあげ直ちに頭を切つて殺し，脊側の骨格筋を切りとり，次のようにして抽出を行つた。

Table 1. Preparation of carp actomyosin

Minced muscle 50 g.

+ 0.6M KCl 250 ml. blend (3 min.) and centrifuge (4000 r. p. m., 30 min.)

S_1 (Supernatant)　　P_1 (Precipitate)

+ H_2O → 0.2M KCl, Centrifuge (4000 r. p. m., 30 min.)

S_2　　P_2

+ 1.2M KCl equal Vol. → 0.6M KCl, Centrifuge (4000 r. p. m., 30 min.)

S_3　　P_3

↓

0.6M KCl Actomyosin solution

蛋白濃度はビューレット法[1]により測定したが，度々ミクロキエルダール法を併用しビューレット法による値に補正を加えた。

4. 粘度の測定温度

粘度の測定温度は，特に記してないものは 10°C ± 0.5°C である。なお測定温度が粘度に及ぼす影響については実験の項参照。

---

* 理論的には次式[3]が導かれる。

$$\eta_r = \frac{4/t_0}{3/t_s + (1/t_0)\dfrac{d\,1/t_s}{d\,1/t_0}} \cdot \frac{\rho_s}{\rho_0}$$

但し，ρ_s, ρ_0 はそれぞれ溶液及び溶媒の密度である。実験に用いたようなうすい溶液では $\rho_s \fallingdotseq \rho_0$ また $1/t_s$ 及び $1/t_0$ の二次項以上を無視して，$(1/t_0)\dfrac{d\,1/t_s}{d\,1/t_0} = 1/t_0 \times -t_s^{-2}/-t_0^{-2} = t_0/t_s^2$ とすることができる。従つて η_r は (1) 式のようになる。

** (2) 式は元来ニュートン流体についての式であるが，うすい溶液では非ニュートン流体にも適用される。

実 験 結 果

1. 試料溶液の安定性

傾斜型粘度計を用いて溶液の濃度及び速度勾配をかえて一連の測定を行うには約 60 分を要するので，この間に溶液の粘度の変らないことを確めておく必要がある。そこでコイーアクトミオシンの 0.06% 及び 0.20% 溶液を一定時間 10°C に放置した後，その温度で比較的低速度勾配 ($\bar{\beta}=65\sim120$) におけるそれぞれの粘度をみたが，Table 2 に示すように，実験条件の範囲では殆んど変りがない。溶液濃度 0.12%，放置及び測定温度 20°C とした別の実験においても同様の結果がえられた。即ち，コイーアクトミン溶液は傾斜型粘度計によつて粘度の測定を行うに充分の安定性をもつている。

Table 2. Chang of viscosity during storage of carp actomyosin solution
Temp. 10°C

Concentration	Time of storage	$\bar{\beta}$	η_r
0.20%	0	100	5.49
		65	5.69
	15 min.	100	5.40
		65	5.69
	30 min.	100	5.46
		65	5.69
	60 min.	100	5.40
		65	5.69
0.06%	0	120	1.82
		90	1.82
	30 min.	120	1.82
		90	1.82
	60 min.	120	1.82
		90	1.82

2. 粘度の速度勾配依存性

コイーアクトミオシンを 0.13, 0.10, 0.05% の三種類の KCl 溶液とし，各濃度につき速度勾配をいろいろに変えて相対粘度を測定すると，ウサギやコイのアクトミンについての既往の実験結果から予期されるように，η_r は $\bar{\beta}$ が高くなるにつれて低くなること，蛋白濃度が濃いものはうすいものに比べて $\bar{\beta}$ に対する依存性が顕著であるという結果がえられた (Fig. 2)。

1本の傾斜型粘度計で得られる速度勾配の範囲はその管径と溶液の濃度できまつてしまうので，$\bar{\beta}$ のごく低いところの測定はできないが，適当な管径の粘度計をえらび組合せて用いることによつて $\bar{\beta}$ 40 位から測定が出来る。そのようにして非常に低い速度勾配における相対粘度を求めると $\bar{\beta}$ が非常に小さいところではもはや流速に影響されずに一定の η_r が得られる (Fig. 2)。

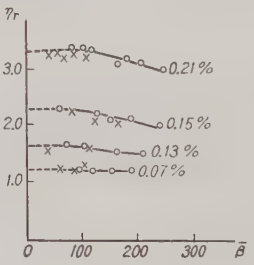


Fig. 2. Relation between η_r and velocity gradient with carp actomyosin solution.
Horizontal parts of the curves are shown at shear rates below 100 sec^{-1}
○×…Two different pipettes.
×…Radius of capillary 0.376 mm.
○… 〃 0.438 mm.
Solvent…0.6 M KCl; Temp.…5°C

3. コイーアクトミオシンの固有粘度

ニュートン流体の粘度は濃度によつて変るが，流速には関係がない。従つてその固有粘度 $[\eta]$ は

$$[\eta]=\lim_{c\to0}\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)=\lim_{c\to0}\left(\frac{\ln\eta_r}{c}\right)\qquad \text{但し，}\eta_{sp}=\eta_r-1\ (c\text{ は g/100ml})$$

と定義され，$\eta_{sp}/c\sim c$ 曲線または $\ln\eta_r/c\sim c$ 曲線を $c\to0$ に外挿することによつてもとめられる。しかるにアクトミオシン溶液の粘度は c のみならず $\bar{\beta}$ の如何によつても違うので，その固有粘度は c 及び $\bar{\beta}$ を 0 に外挿したときの η_{sp}/c または $\ln\eta_r/c$ の値をとるべきである。

$$[\eta]=\lim_{\substack{c\to0\\ \bar{\beta}\to0}}\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)=\lim_{\substack{c\to0\\ \bar{\beta}\to0}}\left(\frac{\ln\eta_r}{c}\right)$$

それにはまず各濃度について $\bar{\beta}\to0$ における η_r を求めねばならないが，市販の傾斜型粘度計では，0.05%

程度のうすい溶液については $\bar{\beta} < 40$ の測定ができず，0への外挿に正確を期し難い。ところが非常に都合のいいことに，この実験に用いる濃度の範囲では大体 $\bar{\beta}$ が 100 以下になると，上述のように流速に関係なく一定の η_r がえられる。そこで $\bar{\beta}$ の低いところで数点 η_r を測定し，η_r が $\bar{\beta}$ に依存しなくなつた点における η_r を $\bar{\beta} \to 0$ における η_r とみてさしつかえないであろう。そのようにして各濃度について求めた η_r から η_{sp}/c または $\ln \eta_r/c$ を c に対して図示し，$c \to 0$ の値をとつて $[\eta]$ とする。この外挿のさい $\eta_{sp}/c \sim c$ 曲線，$\ln \eta_r/c \sim c$ 曲線の何れを用いても同一の結果になるが，今回行つた多くの実験では $\eta_{sp}/c \sim c$ 関係は常に Fig. 3 にみられるように曲線となつたが，$\ln \eta_r/c \sim c$ 関係は多くの場合大体直線に近いので，外挿値を求めるに便利である。

このようにして求めたコイーアクトミオシンの $[\eta]$ は試料により著しい差があり，2.0～6.0 の間にあつた。

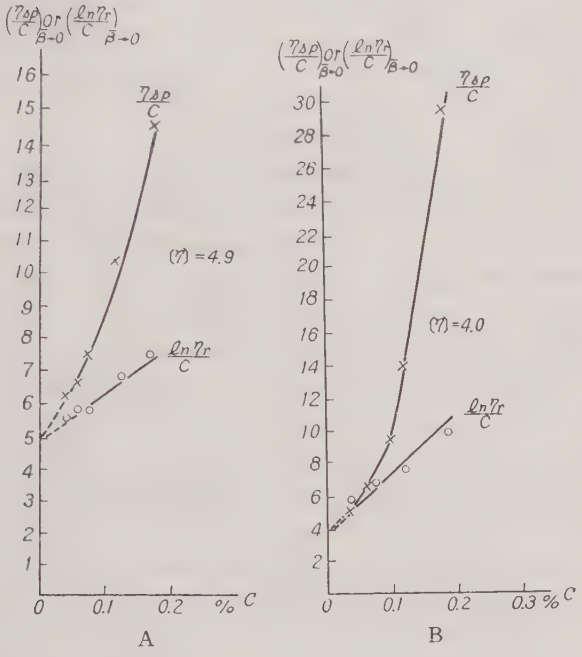


Fig. 3. Relation between $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0}$ or $\left(\frac{\ln \eta_r}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0}$ and concentration. Intrinsic viscosities are obtained by extrapolating c to zero.
A, B……Two different samples.
A… $[\eta] = 4.9$　　B… $[\eta] = 4.0$

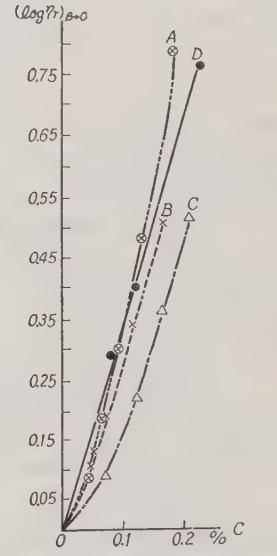


Fig. 4. Relation between $(\log \eta_r)_{\bar{\beta}\to 0}$ and concentration.
Curve: A…Exp. on 6th Oct.; B…2nd Oct.; C…24 th Sept.; D… 1st June (Rectilinear relation)

4. コイーアクトミオシンの粘度数 (Z_η)

$[\eta]$ を求めるためには 4～5 点の濃度について $(\eta_r)_{\bar{\beta}\to 0}$ を測定しなければならない。そこで簡便法としてただ一つの濃度について測定した値をもつて試料の粘度を代表させるために粘度数 (Viscosity number) $Z_\eta = 2.3 \log \eta_r/c$ (c は mg/ml) がしばしば用いられている。但し Z_η がこの目的に用いられるためには，$2.3 \log \eta_r = K \cdot c$ という関係が成立することが必要である。コイーアクトミオシンについてこの条件が満足されているかどうかを検討した結果は，Fig. 4 に示すとおりである。速度勾配の影響をたつために $(\eta_r)_{\bar{\beta}\to 0}$ をとつてある。図に明らかなように，直線関係のえられた一例もあつたが，$\ln (\eta_r)_{\bar{\beta}\to 0} \sim c$ の関係は一般には曲線となり Z_η は測定濃度によつてちがつてくる。例えば，Fig. 4 の曲線 A の試料については Z_η の値は測定濃度 0.18～0.05% の間で，1.0 から 0.44 の間でかわり，曲線 B の試料では 0.17～0.05% の濃度

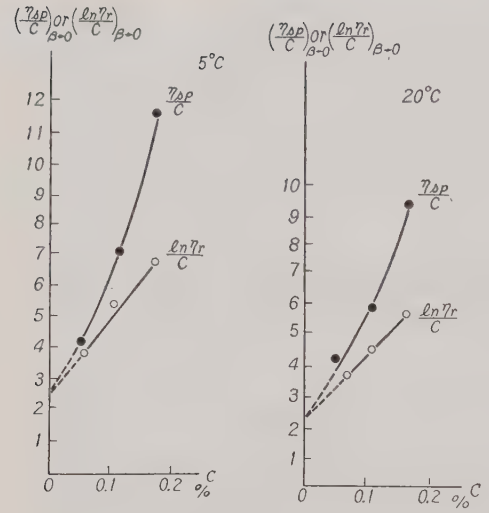


Fig. 5. Difference in intrinsic viscosity at 20°C and 5°C

範囲で 0.74～0.54 の差異がある。このような場合には特に Z_η を求める意味はない。

5. 測定温度の影響

粘度の測定を 20°C と 5°C で行つた場合，(i) $[\eta]$, (ii) $\eta_{sp}/c \sim c$, $\ln \eta_r/c \sim c$ の関係に変化があるかどうかを検討した。その結果は Fig. 5 にみられるごとく同一試料について 20°C で測定したものは $[\eta] = 2.2$, 5°C で測定したものは $[\eta] = 2.5$ である。$\eta_{sp}/c \sim c$, $\ln \eta_r/c \sim c$ の関係をみると 20°C における場合と，5°C の場合と，その傾向が全く同じでただ 20°C の場合がいく分 $[\eta]$ の値が低いのみである。

考　　察

1. 粘度の速度勾配依存性

速度勾配があまり小さくない範囲 ($\bar{\beta} > 100$) におけるアクトミオシンの速度勾配依存性については，既に多くの実験[1,2,5]があり，いずれも同様な結果がえられているので問題はない。しかし速度勾配のごく低いところ ($\bar{\beta} < 100$) での実験はきわめて少いばかりでなく，実験条件や計算の基礎の明記されていないものが多く論議の対象となしうるものは，われわれの見た文献の中では，HAMOIR[6] がコイーアクトミオシンについて行つたもののみである。しかし HAMOIR の結果とわれわれの結果 (Fig. 2) とは一致していない。HAMOIR は毛管に空気溜めをつなぎ，水柱で 0～15 cm までの間の圧を加えうるようにした粘度計を用い，約 0.1～0.2% 溶液について最低 10～25* sec^{-1} (液の濃度によつて異なる) の $\bar{\beta}$ のところまで測定している。それによるといずれの濃度においても $\bar{\beta}$ が小さくなるほど η_r の $\bar{\beta}$ への依存度 ($\eta_r \sim \bar{\beta}$ 曲線の傾斜) は大きくなつている。従つて $(\eta_r)_{\bar{\beta}\to 0}$ は $(\eta_r)_{\bar{\beta}=25}$ に比べ，0.1% 以下の溶液でも幾分大きく，0.15% 以上では著しく大きくなつている。ところがわれわれの実験結果 (Fig. 2) では $c = 0.07 \sim 0.20\%$ の溶液についていずれも $\bar{\beta} < 100$ 以下では η_r の上昇はみられず，一定値におちつく傾向がはつきりみられる。

粘度－$\bar{\beta}$ 曲線が $\bar{\beta}$ のごく小さいところで平になることは硝酸セルローズ (酢酸ブチル溶液)，ポリスチレン (トルエン溶液) のような非電離性高分子について，またタバコモザイクヴィールス (水溶液) のような蛋白についても観察されている[7]。HAMOIR とわれわれの実験結果の不一致の理由は不明であるが，われわれと同様の結果をえている上記の実験ではいずれも傾斜型粘度計が用いられているので，あるいは粘度計の相異によるものかとも考えられるが，これは単なる想像の域を脱しない。

2. 粘度数 Z_η について

粘度数 $Z_\eta = 2.3 \log \eta_r/c$ なる量が測定条件に左右されないアクトミオシンの粘度を示す量であるためには，粘度が速度勾配の影響を受けないような条件の下で測定された η_r について $\log \eta_r = K \cdot c$ なる関係が満足されなければならない。ウサギーアクトミオシンについて，MOMMAERTS[1] は $\bar{\beta} = 1500 \sim 2000$, PORTZEHL[2] 等は $\bar{\beta} = 2000$，即ち，蛋白粒子が流れの方向に完全に配向した状態で，また HAMOIR[6] はコイーアクトミオシンについて $\bar{\beta} \to 0$ でこの関係を認めている。しかしくり返し行つたわれわれの実験によると，コイーアクトミオシンは原料とした魚による相異 (個体差，季節等) が著しいためであろう一般には直線関係が認められなかつた。従つて，コイーアクトミオシンについては，これを特徴づける 1 つの量として粘度数を求めることは意味はないといえる。なお HAMOIR[6] は魚の冷凍期間 (2～65 日)，抽出時間 (10 分～1 時間) を異

* HAMOIR は $\bar{\beta}$ の計算に KROEPELIN の式 $8V/(3\pi r^3 t)$ を用いているので，われわれの用いた $V/(4\pi r^3 t)$ なる式によると，15～37 となる。しかしこの数字の差はここでは問題でない。

にしたコイーアクトミオシン試料について濃度 0.05～0.5% の間で $\log \eta_r$ と c との関係はただ1本の直線によつて表わされることをみている。但しこの場合速度勾配は濃度によつて 90 から 800 の間で測定の度にちがつている。従つて，この結果の示す事実そのものは，興味ふかいが，これから計算された Z_η は，はつきりした物理的意味をもつていない。

粘度数はまたアクトミオシンを特徴づける一つの量として PORTZEHL 等によつて提唱された **ATP-sensitivity** なる量の算出にも用いられる。

$$\text{ATP-sensitivity} = \frac{Z_\eta - Z_{\eta ATP}}{Z_{\eta ATP}}$$

ここに Z_η 及び $Z_{\eta ATP}$ はそれぞれ ATP を加えた前後における溶液の粘度数である。この量が広く用いられるのは，提唱者のいうように“粘度数は蛋白濃度に無関係であるから，簡単に ATP に対する感受性を比較できる”ためである。しかしそのためには，Z_η は測定条件（濃度，速度勾配）の影響を受けないような量でなければならない。上述のようにコイーアクトミオシンについては一般に Z_η は濃度に無関係ではなく，ウサギーアクトミオシンについては $\bar{\beta}$ が特に大きい場合は問題ないが，OSTWALD ピペットで簡単に求めうる η_r について，$\log \eta_r = K \cdot c$ の関係が成立つか否かをしらべた文献は見当らない。今後検討の要があろう。

3. 粘度～濃度，粘度～速度勾配曲線の意義

濃度が高くなると粘度が著しく増すのは分子間の相互作用によるもの，また粘度が速度勾配の影響を受け易いものは，廻転ブラウン運動の比較的小さいこと，即ち分子の長さの大きいことに関係があると考えられている。この考えによると，$[\eta]_{\substack{c\to 0\\ \bar{\beta}\to 0}}$ は分子が分子間の相互作用や流れの方向への配向の影響をうけず，ブラウン運動のみによつて乱雑な（random）状態にあるときの即ち測定条件に左右されぬ粘度を示すものとして重要なことはいうまでもないが，これを求める手続きとしてえられる η_r～c 及び η_r～$\bar{\beta}$ の関係もまた前者は溶質分子の分子間の相互作用を，後者は分子の配向性の大小（主として分子の不均斉度の大小によつてきまる）を示すものとして重要な意味がある*。

そこで Z_{IMM} が散乱光の強さが溶液濃度及び散乱方向に依存する有様を示した所謂 Z_{IMM} plot にならつて，各濃度における粘度の $\bar{\beta}$ 依存性と各 $\bar{\beta}$ における濃度依存性を 1 つのグラフに表わすと便利である。その場合，粘度を表わすに η_{sp}/c または $\ln \eta_r/c$ をもつてすると図上に固有粘度をも示すことができる。

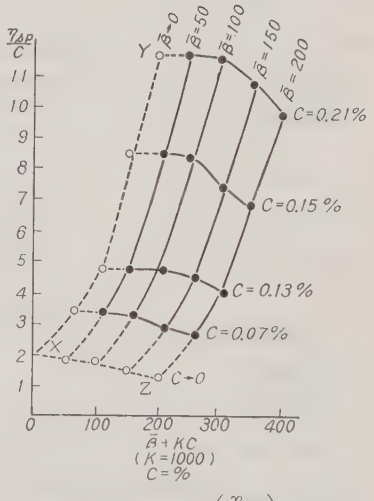


Fig. 6. Viscosity $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)$ plot for various $\bar{\beta}$ and concentrations.

Fig. 6 は，Fig. 2 に示したデーターに基いて η_{sp}/c～$\bar{\beta}+K \cdot c$ なる関係を図示したものである。ここに K は任意の恒数であるが，用いた濃度範囲では $K = 1000$ とするのが便利である。図において横に走る曲線は各濃度における粘度の $\bar{\beta}$ 依存性を，縦に走る曲線は各 $\bar{\beta}$ における粘度の濃度への依存性を示している。点線 XY はそれぞれの濃度における η_{sp}/c を $\bar{\beta}\to 0$ に外挿したときの値を連ねた線，同様に XY はそれぞれの $\bar{\beta}$ における η_{sp}/c を $c \to 0$ に外挿したときの値を連ねた線である。したがつて，XY が縦軸を切る点は，η_{sp}/c をまず $\bar{\beta}\to 0$ とし，次に $c\to 0$ としたときの値，XZ が縦軸を切る点は η_{sp}/c をまず $c\to 0$ とし，次に $\bar{\beta}\to 0$ としたときの値で何れも，$[\eta]_{\substack{c\to 0\\ \bar{\beta}\to 0}}$ を示すので，両線が縦軸を切る点は一致する。

なお XZ 及び XY 曲線は次のような重要な物理的意味をもつている。曲線 XY は $\bar{\beta}\to 0$ 即ち流速の影

* 固有粘度の値は大体同じでも，η_r～c，η_r～$\bar{\beta}$ 曲線が著しくちがう場合もある。

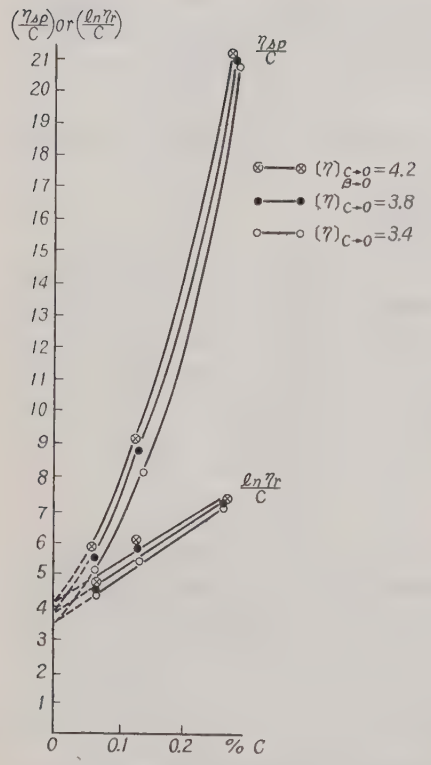


Fig. 7. Variation of intrinsic viscosity $\left(\left[\frac{\eta_{sp}}{c}\right]_{c\to 0}$ or $\left[\frac{\ln \eta_r}{c}\right]_{c\to 0}\right)$ with different shear rates.

響が全くない場合に分子間の相互作用が濃度によつていかに変るかを示す。従つて XY 曲線の傾斜は粒子の相互作用の大小を定性的に示す。曲線 XZ は $c\to 0$ 即ち分子間の相互作用の影響が全くない場合に粒子の配向され易さが流速によつていかに変るかを示す。粒子の配向され易さは分子の不均斉度の大なるほど，またブラウン運動に比し流速の大なるほど著しい。従つて，不均斉粒子においては XZ は一般に下降曲線となり，粒子が配向され易いほどこの曲線の傾きは大きく，球状分子では水平になる。ブラウン運動は粒子が流れの方向に配向されるのを妨げるように働く，しかしてブラウン運動の強さは粒子の長さが増すと著しくへる(ほぼ長さの3乗に反比例する)。従つてたとえ粒子の形がかなり不均斉な場合でも，粒子が小さい場合には配向され難いこともある。従つて XZ 曲線の傾斜から粒子の不均斉度なり長さなりを一義的に結論することはできないが，上記の範囲内において，粒子の形について大ざつぱな智識をうることはできる。

結　論

粘度の測定は簡単であるが，論議のない値を出すことは決して容易ではない。このことはかつてIUPAC*の高分子委員会の企画した協同研究で，同一標準試料について世界第一流の高分子研究室 10 数カ所で測定された結果[8]をみても明かである。即ち第1回の試みのときは結果に満足な一致が見られず，第2回には一般的にみて良好な結果がえられたが，なお研究室の間でポリスチレンの $[\eta]_{c\to 0}$ の値にトルエン溶液では最高 4%，メチル・エチル・ケトンでは最高 9% の差がでている。この原因の1つとして試料は同一のものであるが，各研究室で用いる粘度計や試料溶液の濃度はまちまちであるためにおこる各測定のさいの速度勾配の相異にもとずく影響も無視することはできない**。このことはわれわれが，コイーアクトミオシンの同一試料について $[\eta]_{\substack{c\to 0\\ \bar{\beta}\to 0}}$ を求めると 4.2，$\bar{\beta}$ を考慮に入れないで $[\eta]_{c\to 0}$ を求めると 3.2，次に同じ粘度計の傾斜をつよくして(液の流出時間を大きくして)はかると 3.8 なる値をえたことから推察できる。(Fig. 7)

粘度の変化によつて蛋白溶液の変化を追う場合は簡便法としてできるだけ低い速度勾配の得られる同一粘度計を用い大体同濃度のごくうすい溶液***について粘度をはかつても定性的には一応の結果がえられるかも知れないが，特に試料を特徴づける量の1つとして粘度をはかるときは，非ニュートン体においては面倒でも $[\eta]_{\substack{c\to 0\\ \bar{\beta}\to 0}}$ を求めるべきである。しかも $[\eta]_{\substack{c\to 0\\ \bar{\beta}\to 0}}$ を求める手続の途中にえられる $[\eta]_{\bar{\beta}\to 0}\sim c$，及び $[\eta]_{c\to 0}\sim\bar{\beta}$ 曲線からそれぞれ分子の相互作用及び粒子の不均斉度について大ざつぱな智識をうることもできる。

---

* International union of Pure and Applied Chemistry

** 測定溶液の濃度の差に基く分子間相互作用の影響は $c\to 0$ の値をとつてあるから消されていること。

*** 濃度がごく小さければ，速度勾配の粘度に及ぼす影響は小さい (Fig. 2 参照)。但し濃度が余り少さいと粘度の測定誤差が大きくひびいてくる。

要　　約

傾斜型粘度計を用いて，種々の濃度のコイーアクトミオシン 0.6M KCl 溶液調製直後の粘度を速度勾配をいろいろに変えて測定し，粘度測定に関する基礎問題を検討した。

1. コイーアクトミオシン 0.6M KCl 溶液は調製後約 10°C 及び 20C° に放置した場合，数時間は全く粘度の変化がみとめられなかつた。

2. 蛋白濃度 0.03～0.25% の範囲で実験した結果いづれの濃度に於ても，$\bar{\beta}$ が高くなるにつれて粘度の低下がみられるが，$\bar{\beta}$ が非常に小さいところ ($\bar{\beta} < 100\ \mathrm{sec}^{-1}$) では相対粘度は $\bar{\beta}$ に依存せず一定になる。

3. 固有粘度 $[\eta]$ を $(\eta_{sp}/c)_{\substack{c\to 0\\ \beta\to 0}}$ 或は $(\ln \eta_r/c)_{\substack{c\to 0\\ \beta\to 0}}$ によつて求めると，コイーアクトミオシンについて $[\eta] = 2.0$～6.0 が得られた。

4. コイーアクトミオシンにおいて一般に $\log \eta_r$ と c の間に直線関係がない。したがつて Viscosity number $Z_\eta = 2.3 \log \eta_r/c$ をもとめても意味がない。

5. 測定温度 20°C と 5°C とで $\eta_{sp}/c \sim c$，$\ln \eta_r/c \sim c$ 等の関係に根本的な差違は見出せず，ただ 20°C の方が 5°C より $[\eta]$ がわずかに低い。

6. $(\eta_{sp}/c)_{c\to 0} \sim \bar{\beta}$ または $(\ln \eta_r/c)_{c\to 0} \sim \bar{\beta}$ 曲線の初期傾斜から分子の配向され易さを，また $(\eta_{sp}/c)_{\beta\to 0} \sim c$ または $(\ln \eta_r/c)_{\beta\to 0} \sim c$ 曲線の初期傾斜から分子間の相互作用の大きさをそれぞれ定性的に知ることができる。

文　　献

1) W. F. H. M. Mommaerts: *Arkiv. Kemi. Mineral. Geol.*, **19**, No. 17, 1～20 (1945).
2) H. Portzehl et al: *Z. Naturforsch.*, **5b**, 61 (1950).
3) 黒岩章晃・和田英一: 実験化学講座 **8**, 高分子化学 (上), 167～176.
4) 松本重一郎・金光庸俊: 日水会誌, **21**, 284～8 (1955).
5) J. T. Edsall and J. W. Mehl: *J. Biol. Chem.*, **133**, 409 (1940).
6) G. Hamoir: *Arch. intern. physiol et Biochim.*, **63**, 88～96 (1940).
7) E. Wada: *J. Polymer Sci.*, 14～305 (1954).
8) IUPAC: *J. Polymer Sci.*, **15**, 129～148 (1953); *Ibid.* **17**, 1～20 (1955).

魚肉アクトミオシンの粘度に関する研究—II.
試料の保存による粘度変化

右田正男・鈴木たね子

(1959年6月30日受理)

STUDIES ON THE VISCOSITY OF FISH ACTOMYOSINS—II.
VISCOSITY CHANGE OF CARP ACTOMYOSIN SOLUTION ON STORAGE

Masao MIGITA and Tane-ko SUZUKI*

Intrinsic viscosity of a fibrous molecule is equal to reduced viscosity, η_{sp}/c, as both concentration, c and velocity gradient, $\bar{\beta}$, approach zero; thus $[\eta] = (\eta_{sp}/c)_{\substack{c\to 0 \\ \bar{\beta}\to 0}}$

A tilting viscometer, as reported in the previous paper[1], affords a convenient method for measuring viscosities at varying velocity gradients, but the method requires some 90 minutes for working out a whole measurement. Thus in the present experiment, stability of carp actomyosin solutions are examined, intending to know whether a stock solution could be used in the viscosity measurement as in the case of rabbit actomyosin.

Stock solutions (0.3～0.5% solution of carp actomyosin in 0.6M KCl) were stored at 2～4°C and 20°C respectively, for 0, 1, 3, 4, 24 hrs., and the solutions were diluted to a definite concentration (0.118%), relative viscosity being measured under varying velocity gradients. When stored at 2～4°C, the viscosity was found to have decreased after 1 hr. and went on to decrease up to 3 hrs., approaching a limiting value (Table 1). When stored at 20°C, relative viscosity of carp actomyosin solution remained unchanged at least within 4 hrs., but after 24 hrs. a considerable decrease in viscosity was observed (Table 1).

The same results were obtained in the similar experiments with the solutions diluted prior to storage to desired concentrations.

Rabbit acotmyosin solution stored at 2°C for 24 hrs. showed no change in viscosity (Fig. 4).

Actomyosin prepared from carp muscle stored at 0°C for 24 hrs. gave the same viscosity as that extracted from the muscle immediately after death (Fig. 8).

Carp actomyosin prepared by 24 hr. extraction gave a lower viscosity than that by 3 min. extraction (Fig. 5).

Carp actomyosin solution showed a decrease in intrinsic viscosity from 4 to 2 after 24 hr. storage (Fig. 1) which corresponds to reduction in the axial ratio from 70 to 50 in the case of a prolate. This considerable decrease in asymmetry of the solute molecule may possibly cause decrease in both structural viscosity and inter-molecular interaction. Actually there was observed decrease in slopes of the curves XZ and XY in Fig. 1, which represent the relations of $(\eta_{sp}/c)_{c\to 0}\sim\bar{\beta}$ and $(\eta_{sp}/c)_{\bar{\beta}\to 0}\sim c$ respectively. The decrease in viscosity of the solution on storage, however, could not be attributable to dissociation of actomyosin into actin and myosin, since in salting-out curves the peak corresponding to actin failed to be observed with the both samples, the freshly prepared and stored solutions (Fig. 7).

The value of η_{sp}/c usually decreases with concentration, c, but abnormal cases were occasionally experienced with stored actomyosin solution. Thus η_{sp}/c took a minimum value

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab. Chūō-ku, Tokyo, Japan).

東海区水産研究所業績 B 第320号

at a certain concentration (Figs. 2 and 3). A series of experiments carried out monthly revealed that this abnormal behavior in viscosity was found always with carps in July and August, and sometimes with carps in June (Table 2).

An obvious difference in viscosity behavior was observed also among freshly prepared actomyosin solutions from rabbit and from carps of the two types (Fig. 10). Thus in rabbit, $ln\ \eta_r/c$ is independent on concentration c, in normal carps increase in $\ln\ \eta_r/c$ is proportional to c, and in summer carps, the increase is greater than proportional to concentration.

前報[1]において，われわれはアクトミオシンのような糸状の分子ではその溶液の粘度は濃度によつて変るのみならず，流速によつても変化するので，特に試料を特徴づける量の一つとして粘度をはかるときは $[\eta]^{c\to 0}_{\beta\to 0}$ を求めるべきであること，及び傾斜型粘度計を用いることによつて，この目的を簡単にはたすことができることをのべ，かつ $[\eta]^{c\to 0}_{\beta\to 0}$ を求めるに必要な手段として途中にえられる $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0}\sim c$, $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{c\to 0}\sim\bar{\beta}$ の関係は定性的に分子の形および分子間の相互作用の強弱を推定するのに役立つことを論じた。但しこの方法にしたがつて粘度を求めようとすると一連の測定が終るまでに約 60～120 分を必要とするので，この間魚肉アクトミオシンが粘度的に安定であることが必要である。前報においてはアクトミオシンの 0.6 M KCl 溶液を 10°C に放置した場合に溶液は数時間安定であることを報告した。ウサギーアクトミオシンについては，しばしば従来の研究者はまず Stock solution を調製し，これを数日間冷蔵し，その間必要に応じて，あたえられた濃度にうすめて粘度の測定を行なつている。このようなことが魚肉アクトミオシンについても適用されるかどうか。この問題の検討は，粘度の測定にあたつて実験操作にいか程の余裕を持たせることができるかを知るために必要であり，また保存中における蛋白の変性についても智識がえられるので，特にこれらの点について実験を行なつた。

実 験 方 法

実験材料‥‥コイ，シロウサギ

アクトミオシンの抽出‥‥コイの場合は前報[1]にならい，0.6M KCl で3分間ブレンダーで抽出を行ない，水にてイオン強度 0.2 になるようすめて沈澱させた。

ウサギの場合は，肉の 10 倍量の 0.6M KCl, 0.01M Na_2CO_3, 0.04 M $NaHCO_3$ 溶液を加え，24 時間低温で攪拌抽出を行ない，水を加えイオン強度 0.2 にしてアクトミオシンをおとした。

粘度の測定‥‥傾斜型粘度計を用いて相対粘度，乃至固有粘度 $[\eta]^{c\to 0}_{\beta\to 0}$ を求めた。

実 験 結 果

(I) コイーアクトミオシンの溶液の保存による粘度変化

(i) Stock solution を測定に際して所要濃度にうすめて用いた場合

コイーアクトミオシンの 0.3～0.5% の 0.6M KCl 溶液を調製し，直ちに一定温度に 24 時間保存し，その間適当の濃度にうすめて相対粘度をはかり，また $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0}\sim c$, $\left(\frac{\eta_{ps}}{c}\right)_{c\to 0}\sim\bar{\beta}$ の関係を求めた。

実験 1 ‥‥ Stock solution を調製直後および 2°C に 24 時間保存したものについて $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0}\sim c$, $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{c\to 0}\sim\bar{\beta}$ および $[\eta]^{c\to 0}_{\beta\to 0}$ をもとめた。

その結果は Fig. 1 にみられるとおり 24 時間後の $[\eta]$ は調製直後よりも減少し，$\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0}\sim c$ および $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{c\to 0}\sim\bar{\beta}$ の関係を示す曲線 XY および XZ は明らかにねてくる。

実験 2‥‥保存温度 2°C および 20°C，保存時間 0, 1, 3, 4, 24 時間の粘度変化を測定した。ただし，この場合は，いいろの c における $\frac{\eta_{sp}}{c}\sim\bar{\beta}$ の関係，およびいろいろの $\bar{\beta}$ における $\frac{\eta_{sp}}{c}\sim c$ の関係を求めることは時間的に余裕がないので，濃度を一定にし，流速をかえた場合の相対粘度の時間的変化を追求する

のみにとどめた。その結果は Table 1 にみられるごとく 2～4°C の低温度に保存すると調製後 1 時間にしてすでに粘度の低下がみられ，調製後 3 時間まで急速に減少し，その後はほとんど変らない。しかるに 20°C に保存すると，調製後 4 時間までは全く粘度に変化がみられないが，24 時間後にはかなり減少している。（ただしこの実験では調製後 4 時間から 24 時間の間は測定していない。）

実験 3‥‥実験 1，2 の結果を多数の試料について追試を行なつている間に，アクトミオシン溶液の粘度の時間的変化は常に，実験 1 にみられるように $\frac{\eta_{sp}}{c}$ が c の減少とともに，ただ単純に減少するもののみでなくて，あるコイから抽出したアクトミオシンでは溶液を保存しておくと異常な粘度変化を示す場合があることが明らかとなつた。この点を精査するために，この種の試料の Stock solution をそれぞれ 2～4°C および 20°C に保存し，調製直後，1 時間，2 時間 30 分～3 時間，24 時間後の $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0} \sim c$ の関係を求めると Fig. 2 および Fig. 3 に示す結果がえられた。

Fig. 2 は 2～4°C に保存した場合の結果であつて，調製後 2 時間半を経過した溶液では，濃度の低いところ（例えば 0.05% 以下）では濃度が小さくなると還元粘度 $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)$ は逆に増し，$\frac{\eta_{sp}}{c} \sim c$ $\left(\text{または } \frac{\ln \eta_r}{c} \sim c\right)$ 曲線に極小点が現われる。このような現象は調製後 24 時間，48 時間，2～4°C に保存された溶液についてもみられる。

20°C に 4 時間保存した試料についても同様な結果がえられた (Fig. 3)。20°C に 24 時間以上保存したものは沈澱を生じ，すでに変性していると思われるので，48 時間放置の試料については，粘度の測定を行なわなかつた。

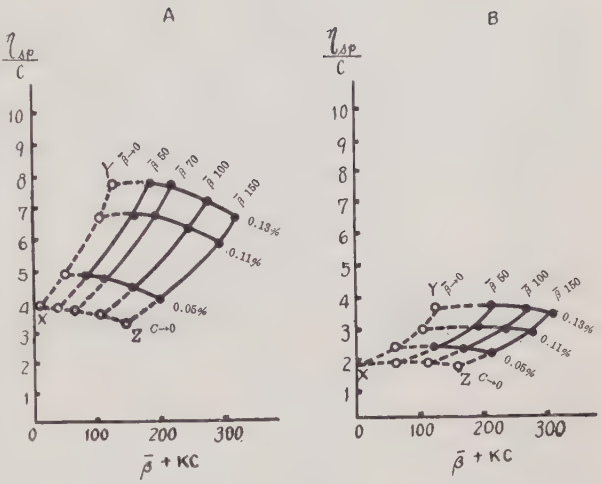


Fig. 1. Viscosity of carp-actomyosin solution (0.6 M KCl) before and after 24 hour storage at 2～4°C.
A. Before storage, $[\eta] = 4.0$
B. After storage, $[\eta] = 1.8$

Table 1. Change of relative viscosity of carp-actomyosin on storage.

A

$\bar{\beta}$	Time of storage (Hour)				
	0	1	3	4	24
0	1.75	1.68	1.58	1.58	1.57
50	1.75	1.68	1.58	1.58	1.57
70	1.72	1.68	1.58	1.58	1.56
100	1.72	1.68	1.58	1.58	1.56
150	1.71	1.67	1.55	1.55	1.54
200	1.70	1.65	1.53	1.53	1.52

B

$\bar{\beta}$	Time of storage (Hour)				
	0	1	3	4	24
0	1.75	1.75	1.75	1.75	1.34
50	1.75	1.75	1.76	1.75	1.35
70	1.75	1.75	1.76	1.75	1.35
100	1.72	1.72	1.72	1.73	1.35
150	1.71	1.70	1.71	1.71	1.33
200	1.70	1.70	1.70	1.70	1.33

Protein concentration 0.118%
A‥‥Storage at 2～4°C
B‥‥Storage at 20°C

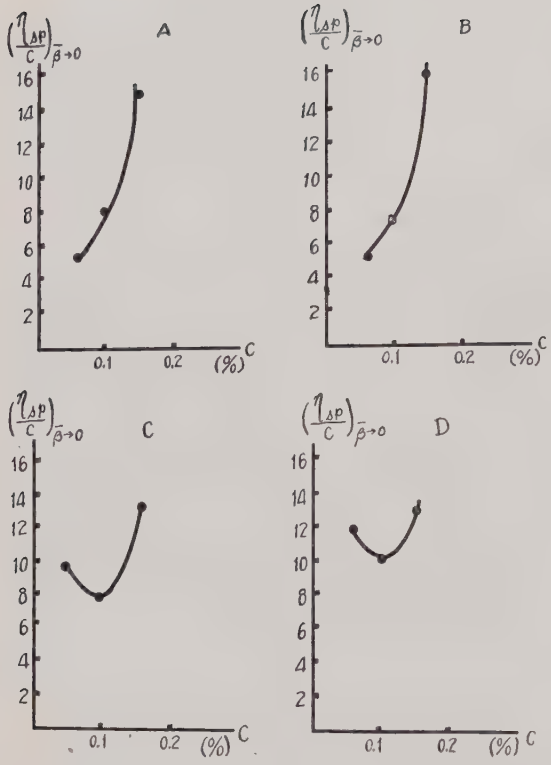


Fig. 2. Change of viscosity of actomyosin solution prepared from summer carp on storage.
A. Before storage. $[\eta] = 2.8$
B. After storage for 1 hour at 2～4°C $[\eta] = 3.0$
C. After storage for $2\frac{1}{2}$ hours at 2～4°C
D. After storage for 24 hours at 2～4°C

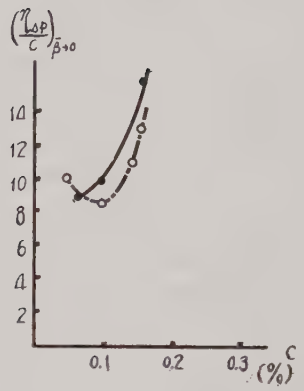


Fig. 3. Change of viscosity of actomyosin solution prepared from summer carp.
—●—, Before storage
—○—, After 4 hour storage at 20°C

(ii) 所要濃度に稀釈した溶液を保存した場合

(i) においては，Stock solution として一定濃度のものを保存し，必要に応じてうすめたが，最初から粘度測定に必要な濃度（約 0.03～0.15% のもの 4 点）の溶液を調製し，そのまま保存して一定時間後にとり出し，(i) と同様に粘度を測定した。

その結果は (i) の場合と全く同様であつた。すなわち，溶液の保存中還元粘度が濃度とともにただ単純に減少する場合と，ある濃度のときに最小となる場合とがあり，そのいずれが現われるかは全く試料の条件（後述）によるものであつて，同一条件の試料は (i) の場合も，(ii) の場合も同様な粘度変化を示した。

保存中還元粘度が単純に減少する場合は 2～4°C に保存されたものは，20°C に保存されたものよりも調製後 4 時間までは粘度の低下が大きいことも (i) の場合と同様である。

(II) 試料によるコイ—アクトミオシン溶液の粘度変化の相異

コイ—アクトミオシン溶液は上述のように試料によつて保存中に還元粘度が濃度とともに下る場合と，ある濃度の時最小となる場合がある。今仮りに前者を正常型，後者を異常型とよぶと，はじめて異常型の現われたのは夏季に実験したものであつて，冬季の実験例の中にはみられなかつた。すなわちどの型が現われるかは魚の個体差でなく季節差によるらしく思われる。この点をたしかめるために年間を通じ，毎月 1～4 回コイのアクトミオシンを抽出し，0.6M KCl 溶液とし，これを放置した場合の粘度変化を追つたところ，$\frac{\eta_{sp}}{c}$ の関係に極小点が出るものは 7～8 月のコイを試料としたものであり，6 月のコイは極小点が現われるものと現われないものとがあつた。試料としたコイは，購入後直ちに殺したもの，約 1 週間畜養（ただし餌は与えない）し，安静状態にしてから用いたものもあるが，これらの影響は認められない。購入先で調べたところ養魚場における飼育方法は 1957 年から現在まで変つていない。したがつて粘度に上記の異常がおこ

るのは全く季節的影響によるコイの生理的変化とみて差支えない (Table 2)。

(III) ウサギ—アクトミオシン溶液の保存中における粘度変化

ウサギ—アクトミオシン溶液ではイオン強度が低い場合 ($\mu = 0.4 \sim 0.8$) には PORTZEHL[2] 等によると数日間の保存によつて，粘度の低下はほとんどみられない。PORTZEHL 等は $\bar{\beta}$ のごく高いところ ($\bar{\beta}=2000$) で粘度を測定しているが，$\bar{\beta}$ を 0 に外挿した時の粘度を測定するわれわれの方法においても，はたして同様なことがいえるか否かを検討するため，0.1～0.04% の間で 4 点の濃度を調製し 2°C に保存，調製直後と 24 時間後の $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0} \sim c$ の関係をもとめた。結果は Fig. 4 に明らかなように調製直後も 24 時間後も固有粘度 $[\eta]^{c\to 0}_{\bar{\beta}\to 0}$ および $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0} \sim c$ の関係に全く変化がみられなかつた。

(IV) 24 時間抽出によるコイ—アクトミオシン溶液の保存による粘度変化

従来文献によるウサギ—アクトミオシンは，24 時間抽出によつて調製されている。しかし，われわれが上記の実験に用いたコイ—アクトミオシンは 3 分間抽出によつて調製されたものである。コイ肉の場合は抽出される蛋白の組成が抽出時間の長短によつてウサギの場合ほど著るしい影響をうけることはないにしろ，何か影響がありはしないかと考え，24 時間抽出によつて調製したコイ—アクトミオシンについて前記と同様な実験を行なつた。同一コイを用いて，片身はブレンダーによる 3 分間抽出を行ない，他はブレンダーにより細かくした肉に 0.6 M KCl を加え，24 時間 2～4°C でゆるやかに攪拌し抽出した。ただし 24 時間抽出をしたものは抽出残渣の外に不溶性のものが上澄中にできたので遠心分離によりこれを除去してからアクトミオシンを沈澱させた。結果は Fig. 5 に示されるが，3 分抽出アクトミオシンの固有粘度 $[\eta]$ は 24 時間経過すると 4.2 から 3.6 に減少し，24 時間アクトミオシンでは 2.2 より 1.0 に減少した。すなわち少なくとも用いた試料については 24 時間アクトミオシンは 3 分アクトミオシンより調製直後の粘度も低く保存中における粘度の減少が顕著のようである。この結果は 24 時間抽出の場合は 3 分間抽出の場合に比し，溶出したアクトミオシンが長時間溶液状態におかれていることを考えれば容易にうなずける。なお 24 時間抽出のアクトミオシン溶液の $[\eta]$ は調製直後でも，3 分間抽出のアクトミオシン溶液を 24 時間保存した時の $[\eta]$ よりも低いことは，24 時間抽出をつづけることにより，

Table 2. Seasonal change of viscosity behavior of carp-actomyosin solution

Exp. date	History of sample	$\frac{\eta_{sp}}{c} \sim c$	$[\eta]$
Oct. 14, 1957	M→L	Normal	4.5
〃 28, 〃	〃	〃	3.7
Nov. 12, 〃	〃	〃	4.8
May 24, 1958	M→A→L	〃	4.0
〃 28, 〃	〃	〃	3.0
June 3, 1959	M→L	Abnormal	4.0
〃 6, 1958	〃	Normal	4.2
〃 30, 〃	〃	Abnormal	3.4
July 22 〃	〃	〃	4.0
〃 25, 〃	〃	〃	／
Aug. 4, 〃	〃	〃	／
〃 6, 〃	〃	〃	／
〃 12, 〃	〃	〃	／
〃 15, 〃	〃	〃	4.8
Sept. 24, 〃	〃	Normal	2.0
Oct. 2, 〃	〃	〃	4.8
〃 6, 〃	〃	〃	4.2

M··Market, A··Aquarium, L··Laboratory

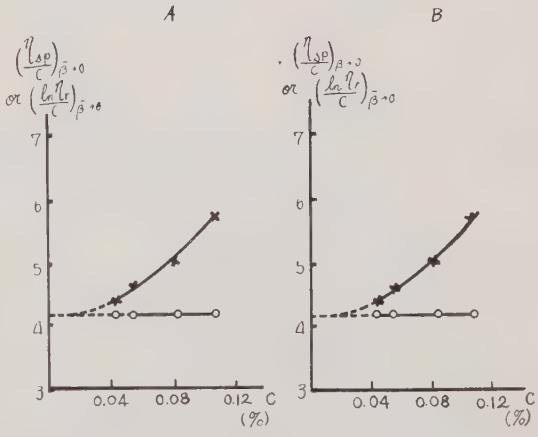


Fig. 4. Viscosity of rabbit actomyosin solution (0.6 M KCl) before and after 24 hour storage at 2～4°C.

$-\times-$ $\frac{\ln \eta_r}{c}$, $-\bigcirc-$ $\frac{\eta_{sp}}{c}$

A····Before storage B····After storage

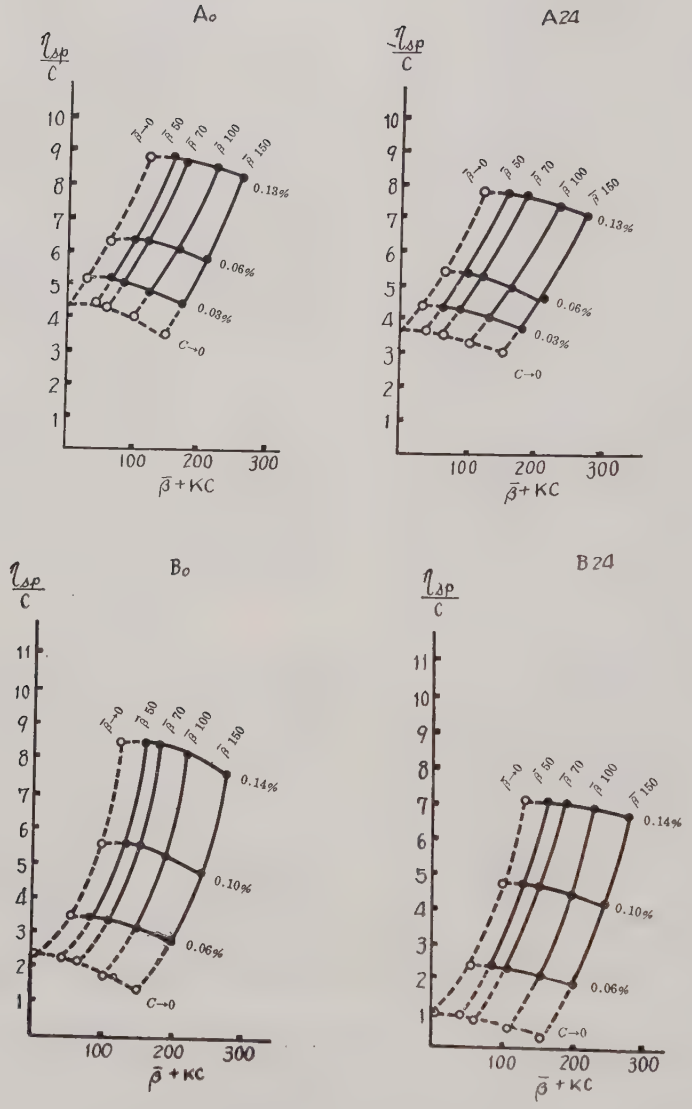


Fig. 5. Change of viscosity of actomyosin solution prepared from carp with different extracting time.

3 min-actomyosin {A_0 ····Before storage / A_{24}····After storage for 24 hours at 2～4°C

24 hour.actomyosin {B_0 ····Before storage / B_{24}····After storage for 24 hours at 2～4°C

3分間抽出のものとは，蛋白の組成が違つているのであろう。

(V) アクトミオシン溶液の塩析曲線

コイ—アクトミオシン溶液の保存中にみられる粘度変化が蛋白組成の変化に因るものか否かをみるために，塩析曲線の変化をしらべた。一定量の蛋白溶液に濃度の異なる一列の硫安溶液をを加え 24 時間放置後沪過し，沪液の波長 278 mμ における吸光度 (S) を測定し，S～C（硫安濃度）図を作り，図上 $-\Delta S/\Delta C$

を求め硫安濃度に対し図示した[3] (Fig. 6, 7)。

(i) ウサギ—アクトミオシン

ウサギ—アクトミオシンの 0.6M KCl 溶液調製直後の塩析曲線は Fig. 6A のごとくなり，硫安濃度 32～38%*にみられる山はアクトミオシン，40～45% にみられる山はミオシンと推定される。溶液を 2°C に 24 時間放置した後は Fig. 6B のごとく，アクトミオシンおよびミオシンと推定される 2 つの山の分離は前ほどはつきりしなくなる。ただし η_r の値は Table 3 にみられるように溶解直後と 24 時間後とで全く変つていない。しかし 2°C に 48 時間放置するとわずかに沈澱を生じ，この沈澱を除去し塩析曲線をもとめると，アクトミオシンの山は平坦になり，硫安濃度 50～60% に新らしい山が現われた (Fig. 6C)。

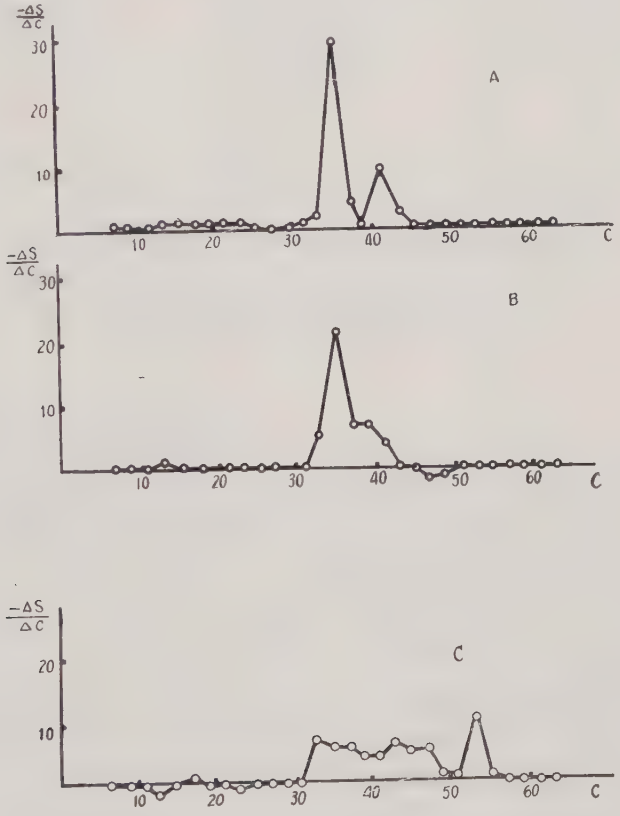


Fig. 6. Salting-out curves of rabbit-actomyosin solution.

S····Extinction at 278 mμ; *C*····Percent (*v*/*v*) of saturated ammonium sulfate solution.

A····Before storage; B····After storage for 24 hours at 2～4°C; C····After storage for 48 hours at 2～4°C

* この値は SNELLMAN 等[3]の 28～32 % に比べるとやや高いが，YASUI 等 (*J. Biochem*, **45**, 717 (1957)) の 28～38%の枠には入る。われわれの試料は "稀釈—沈澱法" による再精製を施されていないが，抽出条件からいつてアクトミオシンを主成分としていることは疑ない。

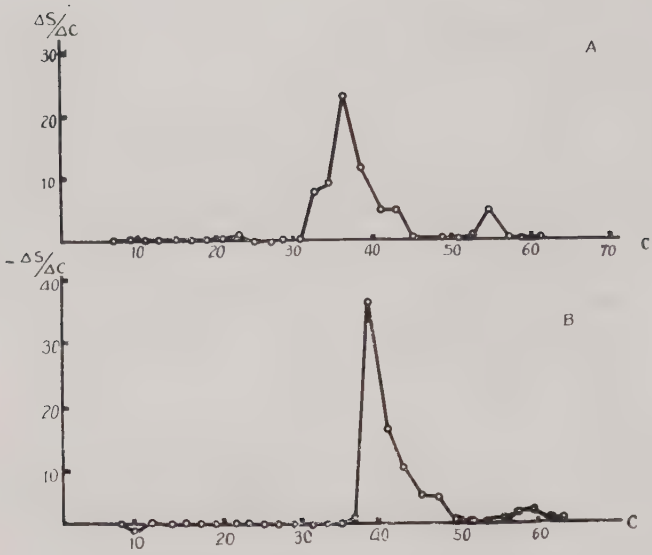


Fig. 7. Salting-out curves of carp-actomyosin solution. A····Before storage. B····After storage (2°, 24hrs.). *S* and *C* are same as in Fig. 6.

(ii) コイ—アクトミオシン

溶解直後のコイ—アクトミオシンの塩析曲線をもとめると Fig. 7 A に示されるように，硫安濃度 33～38% にアクトミオシンの山がみられ，さらに 50～60% の間に低い山がみられる。2°C に 24 時間放置すると粘度はいちじるしく減少する(Table 3)が，塩析曲線 (Fig. 7B) は山が多少高濃度域にずれた程度で本質的な変りはみられない。

(VI) 肉を 0°C に保存した場合の粘度変化

コイ—アクトミオシン溶液の粘度は前述のように保存中に変化する。したがつて一連の実験を行なう場合，Stock solution を用いることができない不便がある。そこで Stock solution の代りに肉のまま冷蔵した場合を検討した。

即殺したコイの片身を用いて直ちにアクトミオシンの抽出を行ない，残りの片身をポリエチレンの袋に入れ氷で 0°C に保存し，24 時間および 48 時間後にとり出し，対照（保存前）と全く同一の条件で抽出を行ない，それぞれのアクトミオシン調製直後の粘度を測定した。結果は Fig. 8 に示すように，0°C に 24 時間保存した肉を原料とした場合は，対照と粘度的には同一なアクトミオシン溶液を作ることができる。したがつて一連の実験に長時間を要するときは，試料を溶液として保存せず，肉のまま 0°C に保存し抽出条件を一定にして作つた試料を用うべきである。

Table 3. Specific viscosity of sample solution used in salting-out analysis

Sample	Protein concentration	Time of storage	$\bar{\beta}$	η_{sp}
Carp	0.3%	0	50	2.00
			60	1.95
			80	1.85
		24	60	1.27
			80	1.27
			100	1.26
Rabbit	0.2%	0	65	1.20
			90	1.06
			120	1.04
		24	65	1.20
			90	1.06
			120	1.04
	0.04%	48	65	0.40
			90	0.40
			120	0.48

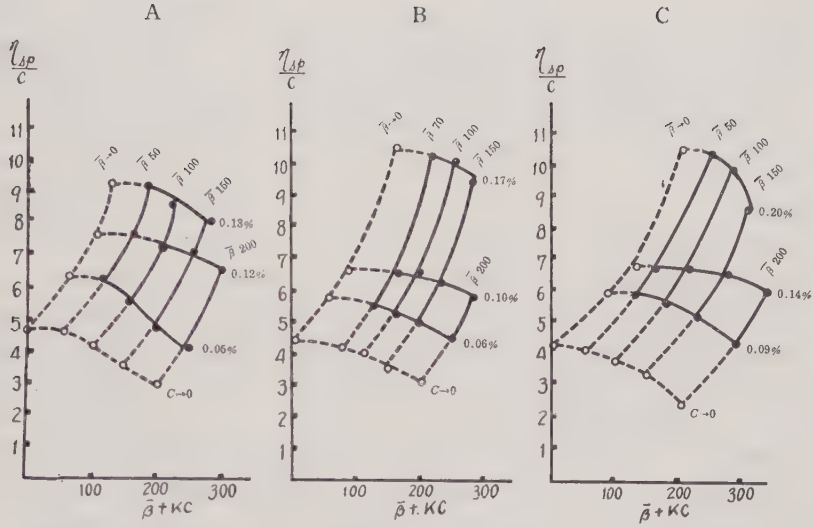


Fig. 8. Viscosity of actomyosin solution prepared from carp muscle stored at 0°C.
A····Before storage. B····After storage for 1 day.
C····After storage for 2 days.

考　　察

コイ—アクトミオシン溶液を24時間放置すると，Fig. 1 にみるように固有粘度は4から2以下に下り，同時に曲線 XZ および XY の傾きは水平に近づいてくる。固有粘度4は分比容（partial specific volume）0.75，水和 33% の細長い回転ダ円体においては軸比 70，固有粘度2は50に相当する。したがつてコイ—アクトミオシン溶液を24時間放置すると，アクトミオシン分子の非対称度はかなり減少することがわかる。分子の非対称度が減少すれば，よく知られているように構造粘性は減少し，また分子間の相互作用も減少すると考えられる。このことは曲線 XZ および XY の傾きがゆるくなつていることにポされている。何故ならば前報に論じたように，曲線 XZ の傾きは，$\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{c\to 0} \sim \bar{\beta}$ の関係，すなわち濃度の影響の全くない条件の下で還元粘度が流速によつて，どの程度変るか（構造粘性の程度）を示し，曲線 XY の傾きは $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0} \sim c$ の関係，すなわち流速が全くないような条件の下で還元粘度が濃度によつてどの程度変るか（分子間の相互作用の程度）を示し，両曲線が水平に近づくことは，それぞれ構造粘性および分子間相互作用の減少を意味するからである。

分子の非対称度の減少の原因としては，分子の side to side の集合，あるいは糸状分子がより丸まつた形になることが考えられるが，そのいずれかを知るには粘度測定の結果だけではできない，別に分子量，分子のひろがりを知る必要がある。

なお，アクトミオシンの場合にはアクトミオシン ⇄ アクチン＋ミオシンなる解離も，放置による粘度低下の原因ではないかと一応考えられぬこともない。しかしコイアクトミオシン溶液の塩析曲線をみるに，調製直後と 24 時間放置後の溶液では山の形に多少のちがいはあるが，いずれもアクトミオシンおよびミオシンと推定される山からなり，もし放置後の溶液中に上記のような解離がおきていたとすれば，硫安濃度 10～20% のところに当然予期されるアクチンの山は全く認められない。すなわち粘度の低下をアクトミオシンの解離によるものとすることはできない。

分子の非対称度の減少は，その機作がいずれにあれ，分子間の相互作用の減少の原因となりうる。非対称度が減少すると分子が互いに機械的にからみあう機会が少なくなるし，またしばしば分子の表面における活

性基の数の減少を伴なうことがあるためである。しかし，コイ—アクトミオシン溶液の Methyl-orange との結合量を測定すると溶解直後と 24 時間後とでほとんど差がない[4]。イオン性色素の結合量は分子の表面にあるイオン性基の分布を大ざつぱに示す尺度と考えられる。したがつてコイ—アクトミオシン溶液の放置による分子間相互作用の減少は分子表面のイオン性基の活性の減少によるものではないらしい。

粘度と濃度との関係

実験 (1) および (2) に明らかなようにアクトミオシンの溶液を放置後還元粘度 $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)$ と濃度との関係をみると，ウサギ，夏季以外のコイ，夏季のコイの3つの型がある。夏季のコイにみられるように粘度と濃度との関係に極小点が現われることは一見異常のようにみられるが，これは粘度を表わすのに還元粘度をとつたためで，もし還元粘度の代りに相対粘度 (η_r) をとれば，Fig. 9 に示すように夏季のコイでもウサギでもいずれも濃度がへれば粘度は下る。ただそのへり方がちがうのにすぎない。放置した溶液について η_r〜c の関係をみると，今回用いた濃度の範囲ではウサギでは直線，夏季以外のコイでは凹型 (concave) 曲線，夏季のコイでは濃度 0.1% 附近に彎曲点をもち，それ以上は凹型，それ以下では凸型 (convex) の曲線となつている。すなわちウサギでは相対粘度が濃度に比例してへり*，夏季以外のコイでは濃度に比例する以上に粘度がおち，夏季のコイでは 0.1% 以下の濃度では粘度のへり方が濃度に比例するよりも小さいにすぎない。

濃度のごく小さいところでは，分子間の相互作用の影響は小さいから，うすめられることによつて粘度に影響を与えるものは，溶質の占める容積の減少と分子の形の変化であろう。溶質の占める容積は大体濃度に比例するから，ウサギの場合濃度のごく小さいところで，η_r が c に比例しているのは，濃度の減少が粘度におよぼす影響は主として溶質の容積の減少に基くものであつて，溶存しているアクトミオシンの形は溶液の濃度が小さくなつても変つていないのではないかと想像される。これに反してごく低い濃度で粘度が濃度に比例する以上に下る夏以外のコイの場合は濃度が小さくなるとアクトミオシン粒子がまるまつた状態になり，粘度が濃度に比例するよりも高くでる夏の

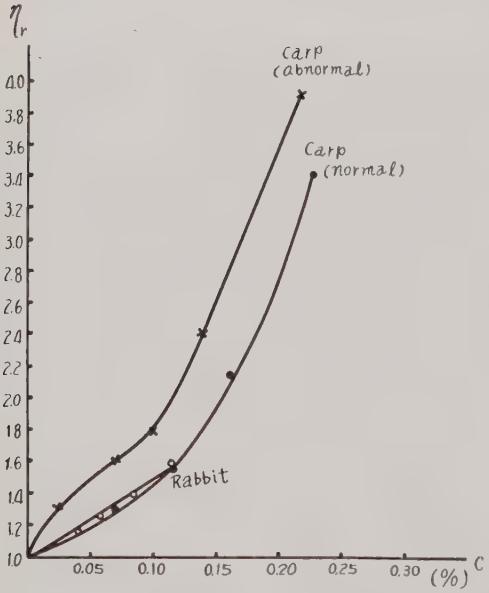


Fig. 9. Dependence of relative viscosity on concentration for carp and rabbit actomyosins.
Carp (abnormal)····Summer carp
Carp (normal)····Carp in other seasons.

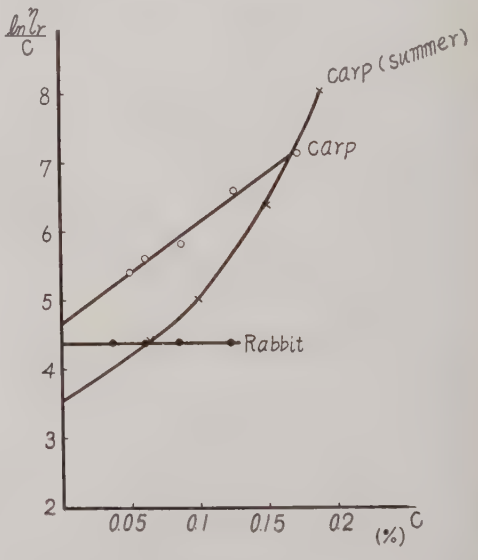


Fig. 10. Dependence of $\frac{\ln \eta_r}{c}$ on concentration for carp and rabbit actomyosins.

* もつと高濃度のところではウサギの場合も凹型曲線となる。

コイでは粒子がひろがつた状態になつているのではないだろうか。ただし，このアクトミオシンの分散状態の変化は，溶液がただうすめられたために起つたものではなく，放置されることによつて生じたものである。何故ならば調製直後の溶液をうすめても上述の粘度変化はみられず，また Stock solution を放置後うすめても，はじめから所要濃度にうすめた液を放置しても同様な粘度変化を示すからである。

粘度に η_r をとり $\left(\frac{\ln \eta_r}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0} \sim c$ の関係をみると常に Fig. 10 に示すように夏のコイ—アクトミオシン溶液は放置後ばかりでなく調製直後においてもウサギや夏以外のコイ—アクトミオシンと明らかに異なるところがある。すなわちウサギ—アクトミオシンでは $\left(\frac{\ln \eta_r}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0}$ の値は c に関係なく一定，夏以外のコイでは c とともに直線的に変化するが*，夏のコイでは c が増すと $\left(\frac{\ln \eta_r}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0}$ の値は c に比例する以上に増す。このことは繰返し行なつた多数の実験によつて確認された。したがつてこのことは実際問題として固有粘度 $[\eta]^{c\to 0}_{\beta\to 0}$ を求めるとき，測定にどの程度時間の余裕をみることができるかを予知するに役立つ。すなわち抽出したアクトミオシンを溶解し，直ちに $\left(\frac{\ln \eta_r}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0} \sim c$ の関係をみてこれが直線関係にあるときは 10～20°C に保存すれば数時間は粘度が安定であるが，曲線になれば調製直後の溶液について粘度をはかる以外いずれの温度に保存しても，時間の経過とともに，$\frac{\eta_r}{c} \sim c$ $\left(\text{または } \frac{\ln \eta_r}{c} \sim c\right)$ の関係に極小点が現われ $[\eta]$ を求めることはできない。

摘　　要

1) コイ—アクトミオシンの 0.6M KCl 溶液を 2～4°C に 24 時間保存すると，保存前にくらべて，その $[\eta]$ は減少し，また $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0} \sim c$, $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{c\to 0} \sim \bar{\beta}$ の関係から，分子の非対称度，分子間の相互作用が減少することが明らかになつた(Fig. 1)。

2) 上記の関係は Stock solution として保存し，測定時に所要濃度にうすめても，また最初から所要濃度にして保存しても結果は全く同じであつた。

3) ウサギ—アクトミオシンの 0.6M KCl 溶液を 2～4°C に 24 時間保存しても保存前と保存後の $[\eta]$ および $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{c\to 0} \sim \bar{\beta}$, $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0} \sim c$ の関係に全く変化がみられない (Fig. 4)。

4) コイ—アクトミオシン溶液を低温に保存し，保存前と後の溶液の塩析曲線をもとめたが，蛋白組成に本質的な差はみとめられなかつた (Fig. 7)。

5) アクトミオシン溶液を放置後還元粘度 $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)$ と濃度との関係をみると，夏季のコイから抽出したアクトミオシンは還元粘度と濃度の関係に極小点が現われ放置したものについては固有粘度を測定することができない (Fig. 2, Table 2)。

6) 即殺したコイの肉を 0°C に保存し，抽出条件を一定にして，アクトミオシンを抽出すると，24 時間，肉を保存したものでは保存前と粘度的に全く変化が現われない。故に溶液として低温に保存するよりも肉のまま 0°C に保存した方が粘度的に安定である (Fig. 8)。

実験結果の吟味にさいし有益な御意見をよせられた松本重一郎氏に感謝いたします。

文　　献

1) 右田正男・鈴木たね子: 本誌, **25**, 127 (1959).
2) PORTZEHL, H., SCHRAMM, G., and WEBER, H. H.: *Z. Naturforsch.*, 5b, 61～78 (1950).
3) SNELLMAN, O., and TENOW, M.: *Biochim. et Biophys Acta.* **13**, 199～208 (1954).
4) 右田正男・大竹茂夫: (未発表).

* $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)_{\bar{\beta}\to 0} \sim c$ の関係を求めると夏以外のコイでも凹型の曲線となる。

致死条件が肉蛋白におよぼす影響—I.

即殺および苦悶死コイのミオシン区蛋白の組成

右田正男・大竹茂夫

日本水産学会誌
第二十六巻 第二号 別冊
昭和三十五年二月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 26, No. 2, Feb. 1960.

致死条件が肉蛋白におよぼす影響—I.
即殺および苦悶死コイのミオシン区蛋白の組成

右田正男・大竹茂夫

(1959 年 11 月 4 日受理)

INFLUENCE OF DEATH CONDITIONS UPON MUSCLE PROTEINS—I.
COMPOSITION OF MYOSINS FROM CARPS KILLED INSTANTLY AND IN ANGUISH

Masao Migita and Shigeo Otake*

In order to examine the influence of death conditions upon the muscle proteins, composition of myosins from two groups of carp was determined by salting-out analysis: one group was put to an instant death by beheading (Control Group), and the other was killed after being left in the air for several hours (Anguish Group).

Salting-out curves of myosins from the both groups were alike in that peaks in the range 30～45% (*v*/*v*) saturation of ammonium sulfate predominated, which are presumed to consist of actomyosin and myosin (Fig. 1 and 2), while, in Anguish Group, a fraction precipitating in the range 10～20% saturation was usually found, such fraction was not found generally in the Control Group (Fig. 1 and 2). This fraction is presumed to be actin, and this was ascertained by a rise of viscosity on mixing the fraction precipitating at 20% saturation and rabbit myosin (Fig. 3). It may be note worthy that actin was fractionated from natural myosins, since it has long escaped from detection by either electrophoretic or ultracentrifugal method.

If myosins were extracted with addition of ATP (1 mg. per g. muscle), from the muscle of carp killed in anguish, actin fraction disappeared in the salting-out curve (Fig. 4).

This as well as the fact that the muscle from Anguish Group contains far less ATP may suggest that appearance of actin in the salting-out curve might be related to ATP content of the muscle.

Sodium pyrophosphate was found to have the same effect as ATP, so far as in causing disappearance of actin fraction in the salting-out curve of Anguish group (Fig. 5).

The results were explained by the following assumptions: (i) In muscle of carp killed in anguish, interaction between actin and myosin might become weakened. The extent of the weakening, however, might be so small as it could manifest itself only in the presence of salt in pretty high concentrations as used in the salting-out analysis. (ii) The weakening of the interaction might be due to a sort of denaturation of actin and/or myosin, induced by certain factors produced in the course of biochemical change in muscle before death. (iii) ATP in the muscle might play a rôle to protect the protein from denaturation.

疲労，刺戟等によつて肉質に変化のおこることは，早くから注目されており，その研究に基いて屠肉の管理は，動物の屠殺前から合理的に行われている。魚類についても比較的苦悶せずに死んだものは“生きがいいとして，釣上げ後直ちに延ズイをさして殺すことが，タイなどの高級魚では行われている。致死条件（即殺か苦悶死か）が魚の“生きのよさ”におよぼす影響については，天野等[1]，藤巻等[2]，野口[3]の研究がある。それによると致死条件による“生きのよさ”の相異は肉の死後硬直の現象（硬直のはじまるまでの時

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab.).

東海区水産研究所業績 B 第 326 号

間，硬直のつよさ，硬直の続く時間）に最もよく現われており，この硬直現象の相異は，致死条件によつて筋肉中の ATP (adenosine-triphosphate) 量に差のあることに関係づけられるようである。これは ATP が解糖作用や筋肉の収縮に，重要必須の役割を果していることから，うなづけるところである。ATP はそのような生理化学的および力学的効果のみならず，蛋白化学的にも筋肉の主な構造蛋白に対して支配的な影響をもつている。したがつて致死条件によつて ATP 含量に著しい変化がおきた場合には，筋肉蛋白自身にも何か影響があるべきように思われる。これについては疲労した筋肉では塩溶液で抽出され蛋白量の減少する事実が DEUTICKE (1932) 以来知られており，また DUBUISSON[1] と JACOB[5] は，溶出する構造蛋白の消長を電気泳動法によつてしらべている。すなわち安静状態にあつたウサギの筋肉から WEBER および EDSALL 法によつて分離したミオシン区蛋白の組成を，電気泳動図からみると，α（アクトミオシンに相当），β（ミオシンに相当）および γ（未知）の3成分からなつており，その含量は $\beta > \alpha > \gamma$ の順である。疲労した筋肉からとつたものでは，α はほとんど全く消え，γ も認められず，β が主成分であることには変りないが，その量は大巾にへつているといわれている。

われわれは致死条件によつて，コイ肉のミオシン区蛋白の組成が，いかに変わるかを，塩析分析法によつてしらべた。

試料および実験方法

試　料

即殺および苦悶死コイ　ここに**即殺コイ**というのは，鮮魚問屋の水槽からすくい上げ，直ちに頭を落し，氷冷して実験室にもち帰つたもので，断頭から抽出開始まで，1時間たらずである。**苦悶死コイ**というのは3～4 時間室温の空気中に放置後，頭を落したものである。

コイのミオシン区蛋白　即殺または苦悶死コイの背部の白肉 30g をとり，300ml の氷冷 0.6M KCl (pH 6.5) 溶液とブレンダーにかけ，2分間抽出し，遠心分離した上澄を氷冷水で3倍にうすめ，再び遠心分離して沈澱をあつめ，ミオシン区蛋白試料とした。

ウサギ-ミオシン　ENGELHARDT[6] の方法による。ウサギをクロロホルム麻酔後 25% $MgSO_4$ を注射，頸動脈を切つて脱血，頭をおとし皮をはぎ内臓を除き，氷水で 10 分間冷した後肉をとる。これを肉ひき器にかけ，0.3M KCl + 0.15M りん酸カリ (pH 6.5) の3倍容と 10 分間ゆるやかにかきまぜて抽出，沪液を水で4倍にうすめて沈澱をとる。これを 0.02M K_2CO_3 にとかし pH 8.3 とする。これに 2M KCl（ミオシン 1g 当り 4ml）を加えた後，約 50 倍にうすめ，沈澱するアクトミオシンを除く。上澄に 1% 醋酸を加えて pH 7 とし，ミオシンをおとす。これを再び KCl にとかし，うすめて再沈澱させる。抽出に用いる器具試薬は，すべて氷冷し，操作は冷室（約 3°C）で行つた。

製品の粘度数 $Z_\eta (= \ln \eta_r / c) = 0.16$

塩析分析

SNELLMAN および TENOW[7] の方法によつた。すなわち，まず次の A, B 2液を用意する。

A 液：　0.1M りん酸塩緩衝液 (pH 6.9) を含む 0.6M KCl 溶液。

B 液：　A 液に硫安を 0°C で飽和させたもの (pH 6.9)。

A 液にコイのミオシン区蛋白試料をとかし (2～3mg· Protein/ml), その 3ml ずつをとり，これに A 液と B液とを適当に混合したもの 7ml を加え，合計 10ml とし，その硫安飽和度 (v/v) を 6% から 64% まで，2% 間隔になるようにした。よく混合した後，冷室（約 3°C）に 20時間放置し，東洋沪紙 No. 2 (定性用) を洗つて乾かしたものでこし，沪液の波長 275mμ における吸光度 (S) をはかる。硫安飽和濃度 $C = 0$ の時の吸光度を 100 とし，$S \sim C$ の関係を図示し，これから $-\Delta S/\Delta C$ を求め，再び C に対して図示するとそれぞれの硫安濃度で塩析された蛋白の量を知ることができる。ウサギの筋肉の主な構造蛋白の硫安に対する沈澱域（各蛋白を沈澱させる硫安の飽和度の範囲）は，SNELLMAN 等[7] によると，アクチン，9～20%；アクトミオシン，28～32%；ミオシン，32～45%；トロポミオシン，55～64% である。

$\Delta_7 P - P$ の定量

試料肉 10g を水 20ml で浸出し，三塩素醋酸で蛋白を除き，沪液を 0.1N の酸とともに7分間，煮沸水中で加熱し，その前後の無機りん酸の差をとる。

結　　果

I. 即殺および苦悶死コイのミオシン区蛋白の塩析分析

コイのアクトミオシンは夏と夏以外の季節では，粘度的にはつきりとちがう性質を示すことが確かめられ

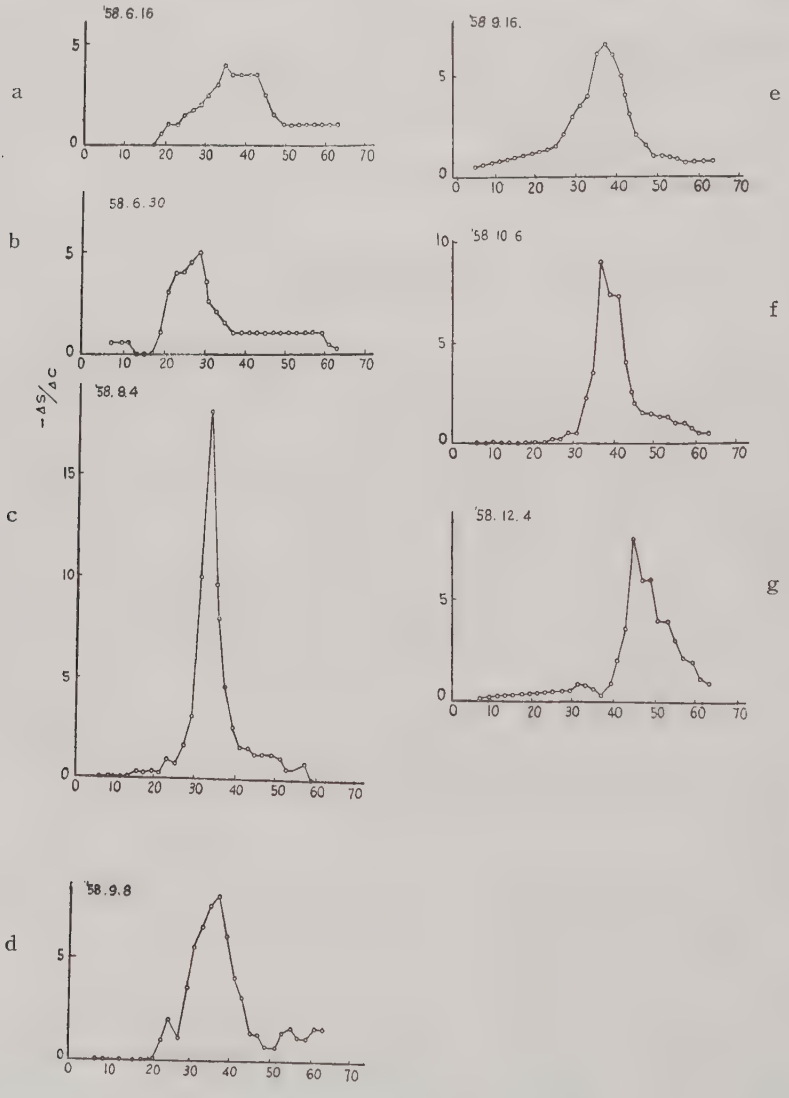


Fig. 1. Salting-out curves of myosins from carp put to instant death. S: the extinction at 275 mμ. The initial extinction is put to 100. C: per cent in volume of saturated ammonium sulfate solution. Equilibrium temperature ca. 3°C. Time for equilibrium: 24 hours. $-\Delta S/\Delta C$: the derived salting-out curve.

ているので[8]，6月より約半年にわたる各季節のコイについて，即殺および苦悶死の2群にわけ，そのミオシン区蛋白の組成を，塩析分析法で求めた。

なおコイのミオシン区蛋白は，稀釈沈澱をくりかえして精製しようとすると，塩溶性を速かに失うのでミオシン区蛋白の全貌をつかむ意味で，抽出液をうすめて生じた沈澱を，そのまま試料とした。したがつて塩析曲線には不明の点も多いが，それでも各群の特徴や相異を充分知ることができた。

Fig. 1, a～g は即殺群についての結果であるが，つぎの2つのことがはつきりいえる。(i) 山の分離は完全ではないが，とにかくいずれも1つの大きな山が，ほとんど全体を支配している。この主峯は，硫安濃度30～45% の間にみられるものが多いが，18～23% (1-b)，または 40～50% (1-g) となつているものもある。(ii) 低濃度 (10～20%) の硫安で沈澱する成分は全くないか，たとえあるらしくみえても (たとえば 1-b) 無視できる程度である。

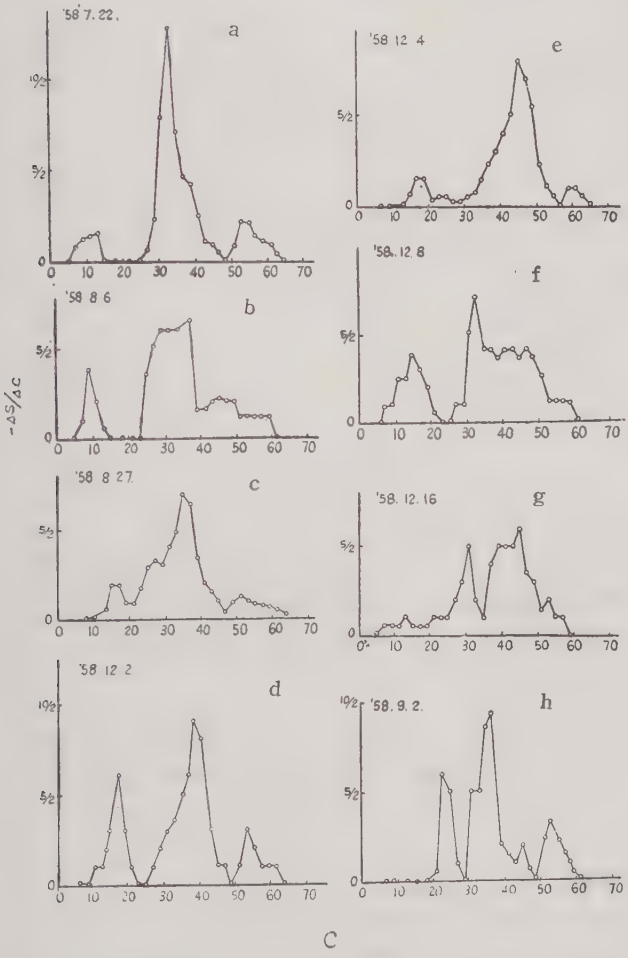


Fig. 2. Salting-out curves of myosins from carp killed in anguish. Conditions as in Fig. 1.

ウサギについて広く認められている筋肉の主な構造蛋白の沈澱域の値が，そのままコイ肉の場合にもあてはまるものとすると，30～45%の主峯はアクトミオシンからなると推定される。試料の不純のため山の分離がわるく，また山の位置のずれも想像されるので，この山を作つているアクトミオシンとミオシンの割合をはつきり推定できないものもあるが，1-c の試料ではアクトミオシン，1-g 試料ではミオシンがほとんど大部分と想像される。

Fig. 2, a～h は苦悶死群の塩析曲線を示す。図に明かなように，この場合もアクトミオシンとミオシンが，主であることは変りないが，即殺群との著しい相異は，アクチンと推定される成分が，8例中1例 (2-h) を除くとはつきりと認められることである。その量は 2-g のように少量の場合もあるが，2-d および f のように，副成分といえる場合もある。なお $C=50$～60% の間に，はつきりした山を示した場合の多いことも，苦悶死群の塩析図の，1つの特徴といえるだろう。この山はウサギの場合に準ずると，トロポミオシンと推定されるもので，即死群の塩析図にも，その存在が認められるような例もあるが，量的にごく僅かであつて，苦悶死群の場合とくらべものにならない。

なお Fig. 1 および 2 を通じ，夏のコイと他の季節のコイの間に，粘度から想像されるような相異を，塩析曲線上に見出すことはできなかつた。

II. 硫安の低濃度区分で沈澱する成分の吟味

即殺群と苦悶死群のコイのミオシン区蛋白にみられるはつきりした相異は，塩析曲線にあらわれたところでは，硫安の 10～20% 飽和でおちるアクチンと推定される部分が，苦悶死群にのみ認められることである。一方，従来の研究によると，即殺型と苦悶死型の筋肉の成分にみられる重要な相異は ATP の含量であつて，苦悶死型のものは，即殺型にくらべて著しく小さい。われわれは，$\Delta_7 P-P$ の値をしらべたが，即殺型 60mg% に対して苦悶死型 5mg% 程度であつた。したがつて ATP 含量の著しく低い試料にアクチンが認められ，ATP 含量のはるかに高い試料にはアクチンが現われないことになる。もしそうだとすれば，多くの研究者によつて，ATP はアクトミオシンを，アクチンとミオシンに解離するとされていることと一見矛盾するようにみえ，はなはだ興味のあることである。従来ミオシン区蛋白の組成について，超遠心法，電気泳動法による研究がしばしば行われているが，これらの方法でアクチンが検出された例は，ないようである。また塩析分析法では，アクチンと思われる山の認められた例[9),10)]と，認められなかつた例[8)]とがある。かつ認められた場合でもその山はごく小さく，特に確認されてはいない。そこで 10～20% 区分でおちるものが，ウサギの場合と同様事実アクチンであることを確める必要があると思い，つぎのような実験を行つた。

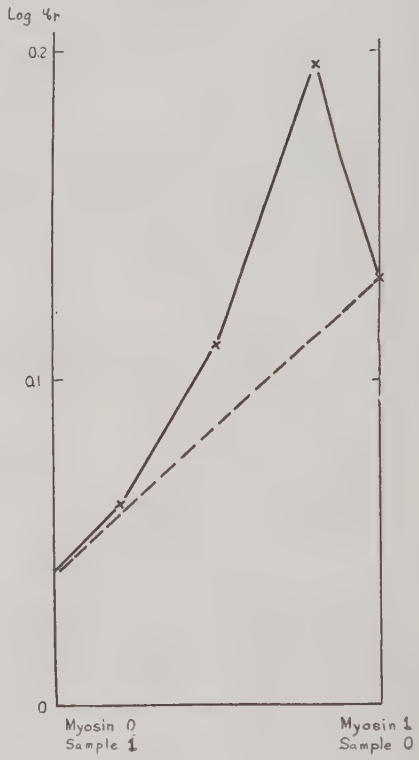


Fig. 3. Viscosity of the mixture of rabbit myosin and the fraction salted-out at 20% saturation (v/v) of ammonium sulfate. Full line: observed viscosity. Broken line: viscosity expected when the sample does not react with myosin.

硫安濃度 20% でおちた区分を集め，これを 20 倍の 0.6M KCl にとかし，この溶液とウサギ肉から抽出したミオシン溶液 (1.7mg/ml) とを，いろいろの割合にまぜ，各混合液の相対粘度 η_r を求め，log η_r の値を両成分の組成に対して図示し，Fig. 3 の実線に示すような結果をえた。もし試料とミオシンとが反応しなければ，混合系の示す log η_r の値は，両成分の示す値の和，すなわち Fig. 3 の点線で示した直線上にあるはずである[11)]。また試料がアクチンの場合には，混合系の示す log η_r の値は，点線で示した直線上の相応する値よりも，高くでるはずである[12)]。Fig. 3 は試料がアクチンであるためのこの条件がみたされていることを示している。このことと，硫安に対する沈澱域の値から，試料はアクチンであるとみてさしつかえない。

III. ATP の添加が塩析曲線におよぼす影響

(i) ミオシン区蛋白の塩析曲線にアクチンの現われること，および (ii) ATP 含量のきわめて少いことは苦悶死型筋肉の大きな特徴といえる。この 2 つの特徴の間に，何か因果関係が，あるか否かをみる手がかりとして，苦悶死したコイの肉を，ブレンダーにかけ蛋白を抽出する際，ATP を添加（筋肉 30g 当り 30mg）したものと，しないものとの塩析曲線をしらべた。

Fig. 4-a および 4-b の実線は，ATP を加えないで抽出した場合の塩析曲線であつて，a 図では，アクチンの大きな山があり，b 図でも，ごく小さいがはつきりした山が認められる。ATP を添加して抽出した場合には，点線で示すように，a 図では 10～20% にあつた大きな山が消えて，10% の辺に小さい山を示すばかりとなり，b 図でも，12% の辺にあつたはつきりした山がなくなつている。すなわち塩析曲線のア

クチン区分に関する限り，ATP を加えて抽出すると，苦悶死型の筋肉が，即殺型の筋肉に著しく近くなることがわかる。

なお，ATP の添加によるアクチンの減少乃至消失を，アクトミオンとミオンの量的関係の変化によつて裏づけたいと思つたが，今回の実験条件の下の結果からは不可能であつた。たとえば，山の分離も比較的よく，かつ ATP の添加によつて 30～45% 沈澱区分にも著しい変化を示している b 図の場合，$C=30\%$ に頂をもつ山をアクトミオン，$C=40\%$ のものをミオシンと推定できないこともないが，そうすると ATP を加えた場合，アクチンの山が消えると同時に，アクトミオシンの山もほとんど消え，ミオシンの山が鋭く高くなつていることになり，この間の事情は簡単に説明できない。

IV. ピロりん酸塩の添加が塩析曲線におよぼす影響

ピロりん酸塩の少量は，0°C でアクトミオシンをみかけ上解離させる作用があり，この点だけについてみれば，ATP と同様の作用がある[13]とされている。そこで ATP の代りに，ピロりん酸塩（抽出液中の濃度 0.1M/l）を添加して，抽出した苦悶死コ

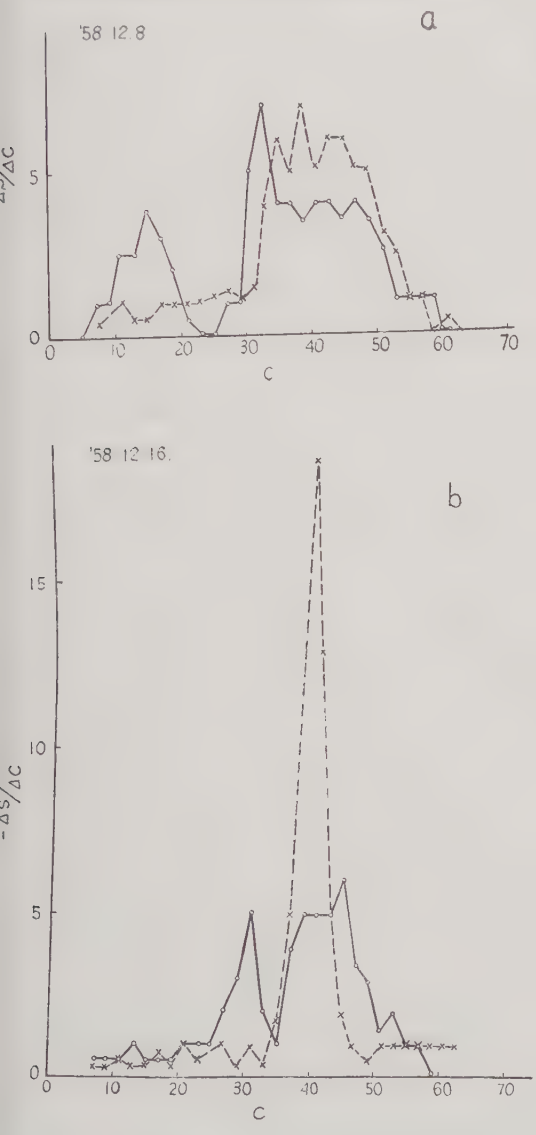


Fig. 4. Influence of ATP on salting-out curves of myosins from carp killed in anguish. -○—○- Control. ··×····×·· Myosins was extracted in the presence of ATP. Conditions as in Fig. 1.

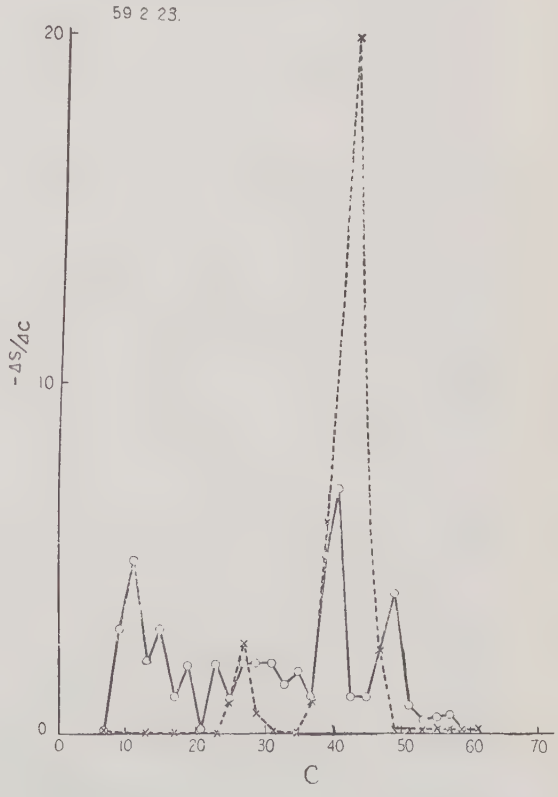


Fig. 5. Influence of sodium pyrophosphate on salting-out curves of myosins from carp killed in anguish. -○—○- Control. ··×····×·· Myosins was extracted in the presence of sodium pyrophosphate. Conditions as in Fig. 1.

イ肉の塩析曲線を求めた。結果は Fig. 5 に示すように，ATP 添加の場合と同様，対照にみえていた硫安飽和 10～20% の大きい山は全く消え，38～50% の山が著しく高くなつている。

すなわちピロりん酸塩を加えることによつても，苦悶死型の筋肉は，即殺型に近い塩析曲線を示すようになる。

考　　察

ミオシン区蛋白よりアクチンの分別　苦悶死コイのミオシン区蛋白の塩析曲線にアクチンが検出され，分別し確認されたことは，注目に値する。何故ならば，アクチンが，ミオシン区蛋白 (natural actomyosin) の構成成分の一つであることは，疑のないところであるが，電気泳動や超遠心分離によつても，その存在を直接証明することは，できなかつたからである*。ATP のようにアクトミオシンをアクチンとミオシンに完全に解離させると，いろいろの点から信じられている物質の存在の下でも，アクトミオシンの構成分としてアクチンを検出することのできないことが，多くの研究者によつてのべられている[14]。最近 HAMOIR[15] はコイ-アクトミオシンについて，同様のことをみている。すなわち 1 時間抽出のコイ-アクトミオシン溶液に，充分多量 (溶液中の濃度 0.5%) の ATP と，0.01 M/l の $MgCl_2$ (ATP-ase の作用を抑える) を加えて，超遠心分離すると，アクトミオシンの山は消えて，新たにミオシンの山が現われるが，アクチンの山は遂に検出できなかつた。多分，F-アクチンの沈降が，あまり速いためであろうといつている。

アクチン区分の出現について，塩析分析の結果は，前にも述べたが，必ずしも一致していない。たとえば右田・鈴木[8] はウサギ—アクトミオシンの塩析分析で，アクチンを認めることができなかつたが，安井等[9] はウサギの，橋本・安井等[10]は牛肉 (*M. semitendineus*) のミオシン B (天然アクトミオシン) について，ごく小さいが，アクチン区分の認められる塩析曲線をえている。このように，人によつて塩析曲線にアクチンの山が，検出できたり，できなかつた例があつたり，またできた場合でも，その山がごく小さいことは，即殺および苦悶死コイについてのわれわれの実験結果から推察すると，原料とした動物の生化学的状態および抽出条件の相異などが，微妙に影響した結果ではないかと思われる。しかしとにかくアクチンの山が認められた例のあることは，塩析分析を用いれば，適当な条件の下では，ミオシン区蛋白から，アクチンを検出しうる可能性のあることを，示すものであろう。

われわれの実験で，コイのミオシン区蛋白からアクチンが検出され，かつ分別されたのは，(i) 苦悶死という特殊の条件の肉を原料としたこと，および (ii) 塩析分析というかなり高いイオン強度の下における分別沈澱法を用いたことに，大きい原因があるように思われる。これらの点については，なお次節に考察をめぐらしてみたい。

アクチン出現の条件　実験の結果によると，コイのミオシン区蛋白の塩析曲線に，アクチン区分が現われるか否かは，筋肉中の ATP の含量と関係ありそうに思われる。ここでまず考えられるのは，ATP がアクチンとミオシンとの結合を切る作用をもつていることである。解離剤の存在の下における筋肉蛋白の抽出については，HASSELBACH および SCHNEIDER[16] の研究がある。すなわちウサギのあらくひいた筋肉をピロりん酸塩をふくんだ 0.6M KCl で抽出すると，アクチンをごく少量しかふくまないミオシンがえられる。HASSELBACH 等はこれを，ピロりん酸の解離作用によるものと考えた。すなわちピロりん酸塩の作用によつて，ミオシンとアクチンとが離れると，長い糸状のアクチン分子は，筋肉組織中にとらえられてほとんど溶出できず，ミオシンだけが，抽出されるというのである。この説明は，われわれの実験結果の解釈に対しても，一見有力な手がかりを与えるようにみえる。しかしわれわれの場合には，この解釈を適用することはできない。何故ならば，第 1 にわれわれは，抽出にブレンダーを用いている。ところが，HASSELBACH 等も注意しているように，アクチンの溶出を妨げるピロりん酸塩の効果のあらわれるのは，あらくひいた肉の場合にかぎり，ブレンダーにかければ，アクチンもミオシンとともに抽出されてくるからである。第 2 に，

* アクチンとミオシンを混合した人工アクトミオシン溶液の超遠心分離では，人によりその条件に不一致の点もあるが，アクチンの山が認められている (BAILEY, K.: "The Proteins" II, p. 987)。

よく知られているように，魚肉の場合はアクチンも抽出されやすく，ウサギ肉の場合，普通ミオシン A のえられるような条件の下ででも，アクトミオシンが抽出される[17]からである。したがつてわれわれの場合には，即殺，苦悶死いずれにしても，塩溶液によつて，アクチンもミオシンも抽出されている，と考えねばならない。しかしこの抽出液から，稀釈沈澱法でえられたミオシン区蛋白中で，アクチンとミオシンとが，どんな状態で存在しているかは，塩析分析の結果によると，致死条件によつて異なるようにみえる。すなわち即殺型筋肉では，アクチンは全部ミオシンと結合してアクトミオシンとなつているが，ミオシンの一部はこの結合に与らず，遊離の状態で存在しているように見える。このことは，DUBUISSON[4]がウサギ，HAMOIR[15]がコイの各ミオシン区蛋白について，行つた電気泳動的研究の結果とも一致している。一方，苦悶死コイの場合には，塩析曲線にアクトミオシン，ミオシンのほか，アクチン区分も認められる。これについては，つぎのような2通りの解釈ができるだろう。(i) 苦悶死型のミオシン区蛋白中では，アクチンの一部はミオシンと結ばれていないで，遊離状態で存在している。(ii) ミオシン区蛋白の成分は，苦悶死型でも即殺型でも，ミオシンとアクトミオシンであることにかわりはない。ただ苦悶死型と即殺型とではアクトミオン中の，アクチンとミオシンとの結合の強さにちがいがあり，それが，塩析分析という特殊の条件の下で，苦悶死型アクトミオシンの一部の解離となつて現われたにすぎない。

現在の段階では，そのいずれかを決定することはできない。しかしわれわれの苦悶死型の筋肉を，疲労した筋肉の一種と考えうるならば，疲労したウサギのミオシン区蛋白の電気泳動図に，アクチン区分の認められないこと[5]は，(i) よりも (ii) の考えに有利である。なお塩析分析は，かなり高いイオン強度*の溶液中で行われるものである。したがつてウサギ-アクトミオシンについて，イオン強度1以上の溶液中では，アクチンとミオシンの結合のよわめられていることが，粘度および ATP 感性の低下から推論されていること[18]は，(ii) の考えを支持するものであろう。

そこで，一応 (ii) の解釈をとれば，苦悶死型筋肉から抽出されたアクチンとミオシンとは，その結合力がある程度よわめられていることになる。一方，この結合力の弱化は，ATP と何か関係ありそうに見える。すなわち，(i) ATP 含量の少い苦悶死型筋肉に認められ，(ii) 抽出のさい ATP を加えれば，回復する。しかし，ATP の従来知られている性質からみて，その含量が少いというだけで，アクチンとミオシンの相互作用の弱化が，おこるとは思えない。相互作用の弱化は，死直前の筋肉の代謝と関係があり，その過程中に，アクチンまたはミオシン，あるいはその双方を，変性させるような要因が生ずるために，おこるのではないだろうか。相互作用の弱化が，即殺したコイ肉には認められず，ATP 含量の少い苦悶死コイ肉にのみ現われることから，ATP は，アクチンまたは（および）ミオシンを，変性から守る役をしているように思える。ATP またはピロりん酸塩の添加によつて，アクチン-ミオシンの相互作用が回復することは，相互作用弱化の原因となつた変性の性格の一面を示すものであろう。

摘　　要

致死条件が肉蛋白におよぼす影響をみるために，即殺および苦悶死の群のコイについてミオシン区蛋白の組成を，塩析分析によつてしらべた。

1) 即殺と苦悶死とを問わず，コイのミオシン区蛋白の塩析曲線は，硫安の 30～45% 飽和の間に，大きな山をもつている。これは，アクトミオシンとミオシンからなると推定される。両群の著しい相異は，硫安の 10～20% でおちる区分が，苦悶死群にのみみられ，即殺群にはみられないことである。この区分は，アクチンと推定されるもので，事実ウサギ-ミオシンとまぜると，著しく粘度の上ることから確められた。

2) ミオシン区蛋白中のアクチンは，今まで，直接検出することさえ，むづかしかつた。しかし，原料として，苦悶死という特殊条件下の肉を，分別法として，塩析分析法を用いれば，分別することもできる。

3) 苦悶死したコイ肉に，ATP を加えて抽出すると，そのミオシン区蛋白の塩析曲線から，アクチン区分がほとんど消えて，即殺型の曲線に近づく。

* 10% 飽和の硫安溶液のイオン強度は1強である。

4) ATP の代りに，ピロりん酸塩を用いても，同様の効果がある。

以上の事実を説明するために，つぎのような推論を試みた。

(i) 苦悶死したコイのアクチンとミオシンとは，互に作用しあう力が，ある程度よわめられている。この相互作用の弱化は，普通の条件の下では明かでないが，塩析分析のような高濃度の塩の存在の下ではじめて現われてくる程度のものである。

(ii) 相互作用の弱化は，筋肉の代謝の過程中に，アクチンまたは/およびミオシンを，変性させるような要因が，生ずるためにおこる。筋肉中の ATP は，この変性を防ぐ役をしているのであろう。

実験に始終協力された中平園子嬢，ならびに結果のとりまとめにあたり，有益な意見をよせられた，松本重一郎，岡田稔の両氏に，深謝いたします。

文　　献

1) 天野慶之・尾藤方通・河端俊治: 本誌, **19**, 487 (1953).
2) 藤巻正生・古城健三: 同上, 499 (1953).
3) 野口栄三郎: 日水研報告 **5**, 1 (1957).
4) DUBUISSON, A.: BAILEY, K. "The Proteins", vol. **II**, p. 1007, Academic Press, New York, (1954).
5) JACOB, J. J. C.: 同上, p. 1008.
6) ENGELHARDT, V. A.: "Advances in Enzymol.". **VI**, 151～153 (1947).
7) SNELLMANN, O., TENOW, M.: *Biochem. et Biophys. Acta* **13**, 199 (1954).
8) 右田正男・鈴木たね子: 本誌, **25**, 319 (1959).
9) YASUI, T., *et al.*: *J. Biochem.* **45**, 717 (1957).
10) HASHIMOTO, Y., *et al.*: Food Research, **24**, 185 (1959).
11) KAUMANS, H. WEBER, H. H., PORTZEHL, H.: "Advances in Protein Chemistry" **VII**, p. 226, Academic Press, New York, (1952).
12) WEBER, H. H., PORTZEHL, H.: 同上, p. 227.
13) STRAUB, F. B.: 同上, p. 228.
14) WEBER, H.H., PORTZEHL, H.: 同上, p. 226.
15) HAMOIR, G.: "Contribution a l'étude de Protéins musculaires de Poisson" (1955), p. 105～106, H. Vaillant-Carmanne, S. A., Liège (1955).
16) HASSELBACH, H., SCHNEIDER, G.: *Biochem. Z.* **321**, 461 (1951).
17) HAMOIR, G.: "The Biochemistry of Fish" p. 18 Cambridge Univ. Press, (1951).
18) WEBER, H. H., PORTZEHL, H.: "Advances in Protein Chemistry" **VII**, p. 218.
19) EDSALL, J. T., MEHL, J. W.: *J. Biol. Chem.* **133**, 409 (1940).
20) WEBER, H. H., PORTZEHL, H.: "Advances in Protein Chemistry" **VII**, p. 218.

天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究—Ⅷ.

Chromatographyによる A 濃縮物の吟味

新間弥一郎・田中稔

日本水産学会誌
第二十五巻 第一号 別冊
昭和三十四年五月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 25, No. 1, May, 1959.

天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究—Ⅷ.

Chromatographyによる A 濃縮物の吟味

新間弥一郎・田中 稔

(1959 年 2 月 27 日受理)

STUDIES ON THE ECONOMICAL MANUFACTURE OF VITAMIN A CONCENTRATE FROM FISH LIVER OIL—VIII.

CHROMATOGRAPHICAL SEPARATION OF VITAMIN CONCENTRATES.

Yaichiro Shimma and Minoru Tanaka*

Of a series of our works, this report is concerened to the chromatographical analysis of vitamin concentrate. The purpose of the chromatography is to clarify the nature of the concentrate and obtain the data necessary for the further concentration. The followings are the outlines of our experiment.

I) Vitamin concentrates obtained by the saponification method were divided into three fractions by the use of chromatographical technique. The qualities and the contents of non-vitamin substances in the fractions were examined (Tables 1, 2, 5 and Figs. 2, 4, 5).

The chromatographic column used, is shown in Fig. 1. As adsorbents, Merk's alumina weakened by 3.3% methanol is used. Dissolve 0.3gr. of unsaponifiable matter in light petroleum to pass through the column and then elute by different solvents into the following three fractions.

Fraction I is developed with light petroleum to make the total volume of solvent 50 m*l*. It contains anhydrovitamin A and other hydrocarbons.

Fraction II is developed with benzene containing 5% methanol, to make the total volume of solvent 50 m*l*, and contains vitamins, sterols, and other mono-, and dihydric-alcohols.

Fraction III is the residue remaining in the column.

II) Maleic anhydride reacts rapidly on conjugated double bonds in vitamin A and other compounds in unsaponifiable matter. Samples of concentrates were treated with maleic anhydride in benzene for six hours on boiling water bath. After saponified, unsaponifiable matter was extrated with ether. The extracts having no conjugated double bonds, were also divided into three fractions by the chromatographical method mentioned above (Tables 3 and 6).

After comparing the result with that of original concentrates (Tables 1 and 5), the weight percent diagrams of vitamin concentrates were obtained (Fig. 6).

III) The same chromatographical analysis was applied to each molecular distillate of vitamin concentrate (Tables 4, 5, 6, and Fig. 3). From the result, it was ascertained that molecular distillation was very useful to refine the concentrate and to remove non vitamin materials, having conjugated double bonds. But the method is not applicable to removing compounds with no conjugated double bonds, for the distillate contains the compounds as much as original concentrate (Figs. 6 and 7).

緒 言

天然ビタミン油を鹸化し，溶剤を以て不鹸化物を抽出後，脱ステロール，その他の処理を行えば 100 万～

* 東海区水産研究所 (Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Chuo-ku, Tokyo, Japan).
東海区水産研究所業績 B 第 310 号.

200 万単位程度のA濃縮物を経済的に製造し得るが，原料ビタミン油の種類によつては濃縮物のA単位が低くA以外の不純物を多量に含む場合がある。このような濃縮物を更に精製して一層純度の高いものとするには，A濃縮物中に存在する不純物の性質を明にする必要がある。

このために著者らはA濃縮物をアルミナによるカラム・クロマトグラフィ（以下クロマトと記す）により検討することにした。不鹸化物のクロマトについては既に報告されているが[1)2)]，著者らはAの経済的濃縮方法を検討する見地からA濃縮物を次の3区分に大別しその割合を求めた。

Ⅰ．Aより吸着され難い区分（以下単にⅠ区分と記す）
Ⅱ．Aを含む区分　　（〃　Ⅱ　〃）
Ⅲ．Aより吸着され易い区分（〃　Ⅲ　〃）

またA濃縮物およびその3区分についてそれぞれ質的検討を行い，その結果A濃縮物から不純物を除去する方法について参考となし得る資料が得られたのでここに報告する。

実　験　の　部

Ⅰ）クロマトによるA濃縮物の区分

（1）実験方法

吸着剤　Merck 製クロマト用アルミナ 100g を磁性のシャーレにとり直火で 30 分間加熱する。放冷後試薬瓶に移し純メタノール 3.3cc を加え振盪し，充分混和した後密栓保存し使用する。

溶　剤　石油エーテル　（日本石油製）石油エーテルを蒸溜し 60°C 以下の溜分をとり使用する。（以下単に P. E. と記す。）

メタノール・ベンゾール混液　精製脱水せるベンゾール 100cc に純メタノール 5cc を加え混和し使用する。（以下 Bz-M と記す。）

クロマト操作　予めクロマト管（Fig. 1）にアルミナを充塡しておき，これに試料約 0.3g（精秤）を 1～2cc の P. E. に溶解し洗い込む。P. E. 溶液がアルミナ層の表面に約 2mm の液量となれば繰返し P. E. をクロマト管にそそぎ込み，滴下する P. E. 溶液が 50cc となればこれを第Ⅰ区分とする。この際試料添加後 8～10 分で黄色乃至橙赤色に着色せる P. E. 溶液が滴下し始め，15～20 分で再び無色となる。次に Bz-M をクロマト管にそそぎ同様にして滴下液 50cc をとりこれを第Ⅱ区分とする。

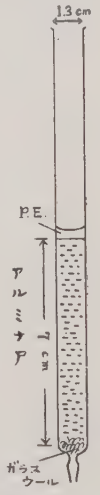


Fig. 1.

滴下する各区分は直接メスコルベンに受けて 50cc となし，その 1cc をとり減圧で溶剤を溜去した後イソプロパノールで稀釈し光度計で所要波長の吸光度を測定する。1cc をとつた残りの各区分はそれぞれ溶剤を溜去後秤量し，得られた値に 50/49 を掛けて各区分重量を求める。試料重量よりⅠ及びⅡ区分の重量を差引いたものをⅢ区分の重量とする。

（2）試　料

○試料 a. 鯨肝油より得られたA濃縮物（106 万単位）*

○試料 b. アブラザメ，スケソウ及び鯨の混合肝油より得られたA濃縮物（74.2 万単位）

以上の外，鯨，アブラガレイ，ヨシキリザメ，スケソウ及び魚種不明の肝油から得られたA濃縮物など8種についてはそれぞれ試料名と単位を Table 2 に記した。

（3）実験結果

試料 a 及び b のクロマト結果を Table 1 に，また試料 a のクロマト各区分の吸収曲線を Fig. 2 に示した。これらの結果に見るごとく試料中のAはⅡ区分中に含まれている。またⅠ区分も相当高い吸収を示して

* 本実験における A 単位はすべて $E^{1\%}_{1cm}$ 328 mμ（エステルの場合）或は $E^{1\%}_{1cm}$ 325 mμ（不鹸化物の場合）に 1,900 を掛けたもので補正していない。なお試料 a 及び b の Oser f はそれぞれ 0.810 及び 0.628 である。

Table 1. クロマト結果 (試料 a 及び b)
Chromatographic fractionation of samples a and b.

試料 Sample	重量 Weight		吸光比 E Value ratio		Vitamin A			屈折率 Ref. index
	g	%	300mμ/325mμ	350mμ/325mμ	I.U. ×10⁴	I.U.×Wt.% ×10⁶	%	n_D^{40}
a	0.3109	100	0.691	0.530	106	106	100	1.5332
I	0.0819	26.3	1.099	0.860	(36.5)	(9.6)	(9.05)	1.5151
II	0.1404	45.2	0.654	0.481	196	88.5	83.5	1.5698
III	0.0606	28.5	—	—	—	—	—	—
b	0.3164	100	0.802	0.572	74.2	74.2	100	1.5360
I	0.0951	30.0	0.833	0.860	(49.9)	(14.95)	(20.15)	1.5366
II	0.1652	52.2	0.797	0.497	106.8	55.7	75.2	1.5500
III	0.0561	17.8	—	—	—	—	—	—

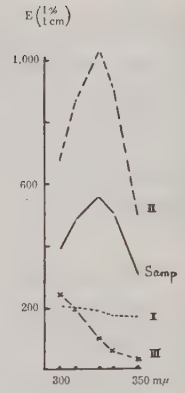


Fig. 2. クロマト区分の吸収曲線(試料 a)
Absorption curves of chromatographic fractions I, II, III, and original sample a.

いるが，これはAによる吸収ではなく，Aの分解物によるものと考えられる**。すなわち，Oser f の著るしく低い試料bにおいてはI区分の吸収が多く，II区分中のAによる吸収は試料の見掛けの吸収の 75.2% にすぎない。

さらに数種のA濃縮物について同様実験した結果を Table 2 に示した。

Table 2. 各種A濃縮物のクロマト結果
Chromatographic fractionation of some vitamin concentrates.

試料 Samples 魚種 Kind of fish		V. A. I. U. ×10⁴	クロマト区分重量 Chromatographic fractions (Wt. %) I	II	II'*	III
抹香鯨	Sperm whale	222	11.6	82.8	(18.6)	5.6
		177	20.2	72.7	(23.2)	7.1
アブラガレイ	Flat fish	187	25.8	67.5	(14.0)	6.7
ヨシキリザメ	Great blue shark	157	33.4	58.7	(17.2)	7.9
スケソウ	Pollack	155	27.5	61.6	(20.0)	10.9
〃		104	39.7	49.9	(20.1)	10.4
不明	Unknown	48.3	45.0	32.8	(22.3)	22.2

* II区分中の A 以外の不純物
Non-vitamin materials in fraction II.

II. A 濃縮物中の非軛化合物の検討

中宮[3] はA濃縮物に無水マレイン酸を反応せしめた後，無水マレイン酸と縮合しない非縮合部を抽出したことを報告している。これはA濃縮物中の不純物で共軛二重結合を有しない化合物（以下単に非共軛化合物と記す）である。A濃縮物中の非共軛化合物含量，ならびに性質を知ることはA濃縮物を更に濃縮する上に重要な手がかりとなると思われるので次の実験を行つた。

試料 5g をとり同量の無水マレイン酸及び精製脱水せるベンゾール 20cc を添加し沸騰浴上に6時間反応せしめる。後ベンゾールを可及的に溜去し局方アルコール 20cc を加え，攪拌しつつ徐々に苛性ソーダ溶液 (NaOH 6g + 水 9cc) を添加する。

** I区分中に含まれる高い吸収を有す不純物については別に報告する。

加温鹸化終了後エーテルを以て不鹸化物を抽出すれば非共軛化合物を得る。

試料a及びbから得られた非共軛化合物の収量はそれぞれ 41.7% 及び 49.7% であつた。試料はいずれも不鹸化物抽出後脱ステロール操作を行つたものであるが，試料bの非共軛化合物中にはなお相当量のステロールが存在していた。このステロールを除去すれば収量 44.5% となつた。

これら非共軛化合物を上記クロマト法により3区分に分けた結果を Table 3 に示した。

Table 3. 非共軛化合物のクロマト結果（試料 a 及び b）
Chromatographic fractionation of non-conjugated compounds in samples a and b.

収量 Yield	Samp. a 41.7%			Samp. b 脱ステロール後 Sterol free 44.5%		
	重量 Weight		屈折率 R.I.	重量 Weight		屈折率 R.I.
	g	%	n_D^{40}	g	%	n_D^{40}
非共軛化合物 Non-conjugated compound	0.2512	(100)	1.4880	0.2756	(100)	1.4920
I	1.1019	40.6	1.4960	0.0879	31.9	1.5010
II	0.0753	30.0	1.4767	0.1402	50.8	1.4868
III	0.0740	29.4	—	0.0475	17.3	—

III. A 濃縮物アセテートの分子蒸溜による濃縮効果の検討

A濃縮物を分子蒸溜して一層高単位の濃縮物を得た報告はあるが[4),5)]，いづれも溜分中のA以外の不純物について質的検討を欠いているようである。そこで著者等は蒸溜々分について上記 I 及び II の方法を適用し，蒸溜によりどのような不純物が除去されるかを検討するため次の実験を行つた。

1) 分子蒸溜溜分のクロマト区分

試料bのアセテート 21g にサラダ油 40g を加え分子蒸溜を行つた結果を Table 4 に示し，各溜分の吸光値の割合 ($E_{1cm}^{1\%} \times$ Wt. %) を Fig. 3 に示した。

Table 4. 分子蒸溜結果（試料 b アセテート）
Molecular distillation of vitamin concentrate (sample b acetate).

	温度 Temperature °C	重量 Weight			Vitamin A			
		g	%	Total %	単位 I.U. $\times 10^4$	収量 Recovery %	Total %	濃縮率 Rate of concent.
Orig. acetate	—	21	—	—	60.5	—	—	—
Fr. 1	75	1.5	7.15	—	56.8	6.72	—	0.940
2	100	4.4	21.0	28.2	82.7	28.70	35.4	1.368
3	120	4.1	19.5	47.7	77.7	25.04	60.4	1.285
4	145	5.4	25.7	73.4	44.8	19.0	79.4	0.740
残渣 Residue	—	—	—	—	(3.7)	(12.6)	92.0	

各溜分を鹸化しそれぞれエーテルで不鹸化物を抽出した後，上記クロマト区分を行つた結果を Table 5 に示した。

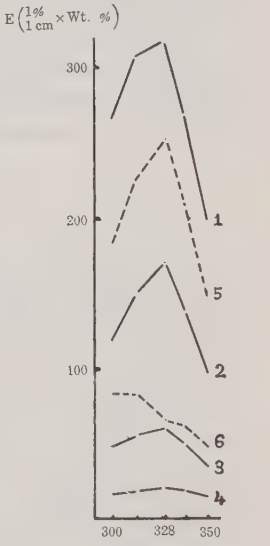


Fig. 3. 分子蒸溜溜分の吸収曲線 ($E_{1cm}^{1\%} \times$ Wt. %)
Total absorption curves of molecular distillates.
1. 試料bアセテート Sample b acetate
2. 溜分 Fr. 2+3
3. 溜分 Fr. 4
4. 溜分 Fr. 1
5. 溜分合計 Total distillates (2+3+4).
6. (1−5)

Table 5. 分子蒸溜溜分のクロマト結果
Chromatographic fractionation of molecular distillates (sample b).

Fr.		蒸溜溜分の鹸化抽出物 Extract of mol. dist.		クロマト区分 Chromatographic fractions		
			脱ステロール後 Sterol free	I	II	III
1	重量 Weight %	80.1	—	48.3	34.8	16.9
	A単位 I. U. $\times 10^4$	69.5	—	(40.4)	125	—
	屈折率 R. I. n_D^{40}	1.5232	—	1.5210	1.5412	—
2+3	重量 Weight %	82.4	—	26.7	47.4	25.9
	A単位 I. U. $\times 10^4$	96.4	—	(59.8)	158	—
	屈折率 R. I. n_D^{40}	1.5345	—	1.5317	1.5625	—
4	重量 Weight %	87.5	73.8	37.8	55.0	6.7
	A単位 I. U. $\times 10^4$	—	59.7	(56.5)	62.5	—
	屈折率 R. I. n_D^{40}	—	1.5222	1.5398	1.5189	—

2) 非共軛化合物のクロマト区分

Aが濃縮されている Fr. 2 及び 3 を合しその非共軛化合物をクロマトにかけ Table 6 のごとき結果が得られた。

試料b及び Fr. 2+3 のそれぞれの非共軛化合物の性質を比較するために両者の紫外及び赤外部における吸収を測定した (Fig. 4 及び 5)。すなわち，紫外部吸収には若干の差が

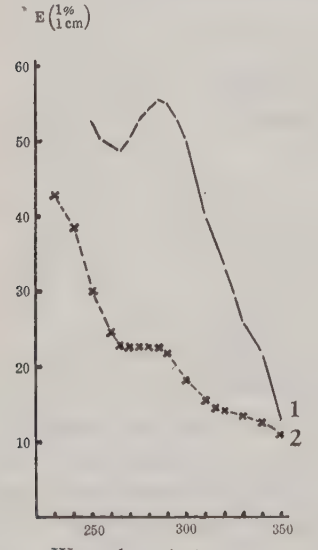


Fig. 4. 非共軛化合物の紫外部吸収曲線
1. 試料b 2. 試料bの分子蒸溜溜分 (Fr. 2+3)
Spectrophotometric curves of sample b, treated with maleic anhydride (1), and molecular distillates (Fr. 2+3) treated with maleic anhydride (2).

Table 6. 非共軛化合物のクロマト結果 (Fr. 2+3)
Chromatographic fractionation of non-conjugated compound in molecular distillates (Fr. 2+3).

	重量 Weight			屈折率 R.I. n_D^{40}
	g	%	Fr. 2+3 に対する% % for orig.	
非共軛化合物 Non-conjugated compound	0.3106	(100)	49.8	1.4778
I	0.0986	31.8	15.8	1.4868
II	0.1638	52.7	26.3	1.4680
III	0.0482	15.5	7.7	—

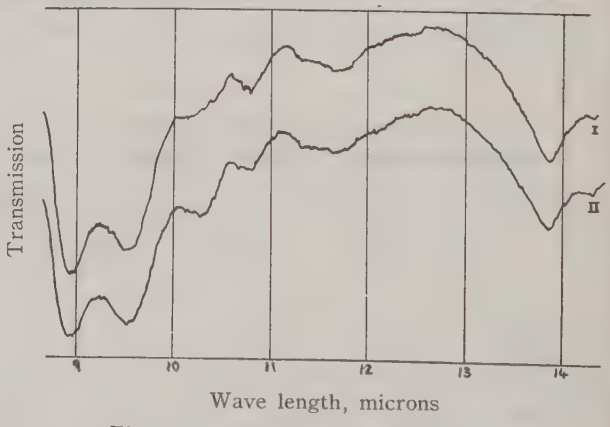


Fig. 5. 非共軛化合物の赤外部吸収曲線
I. 試料b II. 試料bの分子蒸溜溜分 (Fr. 2+3)
Infrared transmission curves of sample b, treated with maleic anhydride, (I), and molecular distillates (Fr. 2+3) treated with maleic anhydride, (II). The percentage transmission is not given as the ordinate because this axis was shifted to permit comparison of the curves. These were, however, protted from percentage transmission data.

現れるが赤外部吸収は極めて良く一致して殆んど差を認めなかつた。

考　　察

1)　クロマト各区分に属する不純物について

上記の実験結果からA濃縮物中の不純物の割合は鮪肝油以外は，III区分＜II′区分*＜I区分の順である。

I 区分　I区分は主に炭化水素より成り，濃縮物に対し 11～45% の割合で存在しA濃度の低いもの程その割合は大となる。I区分中の炭化水素は原料肝油中に存在したもの以外にその後の処理によつて2次的に生成したものもある。例えばAの分解によつて生じたアンヒドロAなどもこのI区分に含まれる。

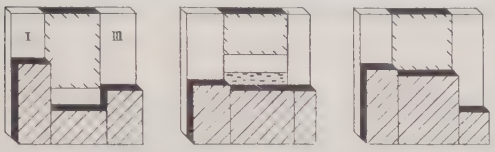


Fig. 6.　A濃縮物の重量組成図
Weight percent diagrames of vitamin concentrates.

Non-conjugated compounds, treated with maleic anhydride.
Conjugated non-vitamin compounds.
Vitamin A
Sterol

スクアレンやプリスタンの如き肝油中に広く存在する炭化水素は 300～350 mμ において著しく低い吸光値を示す。例えばスクアレンの $E^{1\%}_{1cm}$ 325 mμ は約1である[6]。しかるに試料aおよびbのI区分はいづれも200前後のE価を有しスクアレンなどと比較して非常に高い。これはAなどから2次的に生成した炭化水素によるものと思われる。

II′ 区分　II′区分はA濃縮物に対し 14～23 % の割合で存在するが，その割合とA濃度との間には一定の関係を認め難い。Table 1, 3, 5 及び 6 からA濃縮物の重量組成を模型的に図示すれば Fig. 6 となる。この図からも明かなように II′ 区分に含まれるステロールは分子蒸溜によりA主溜分から殆んど除くことができる。II′ 区分の大半を占める非共軛化合物はその赤外部吸収の曲線がバチルアルコールの吸収曲線に類似していることからグリセリールエーテルであろうと思われる。

2)　A 濃縮物アセテートの分子蒸溜について

Table 1, 5 から試料b と分子蒸溜々分とのクロマト各区分の割合を比較すれば，Fr. 1 及び 4 においてI区分が多い。肝油中の炭化水素は比較的低温において溜出することが知られているから[8]，Fr. 1 のI区分は原料肝油中に存在した炭化水素と考えられる。これに反し Fr. 4 のI区分は屈折率および吸光値が高く，また蒸溜温度も高いことからA あるいはその関連物質の分解などにより 2 次的に生成した炭化水素と思われる。

A濃縮物を分子蒸溜してもA濃度がそれ程上昇しないのは試料中の非共軛化合物がAと共に溜出するためである。非共軛化合物は不純物中の大半を占めており，これを除去することは極めて有効な濃縮方法であるが，分子蒸溜によつてはその目的を達することが出来なかつた。

Table 4 および Fig. 3 に見るように分子蒸溜により一般吸収を有する不純物がよく除去され，Oser 補正値は著るしく良くなる。すなわち試料b の Oser f は 0.628 であるが Fr. 2+3 の f は 0.812 で遙かに高い。また溜分の色や臭味も著るしく改善される。これらの点から濃縮物アセテートを分子蒸溜することは一つの有効な精製方法と考えられる。

3)　屈折率について

東[7]はビタミン油はAの屈折率が高いために一般に高い屈折率を示し，A 単位が高くなるに従い屈折率も高くなることを報告している。A濃縮物においても全く同様であり上記のクロマト区分においてもAを含むII区分が最も高い屈折率を示している。

しかるに濃縮物アセテートを分子蒸溜すれば溜分のA単位は高くなるが屈折率は逆に低下する。これは分子蒸溜によつて屈折率の高い不純物が除去されるためである。

* II区分重量よりA重量を引いた重量。即ちII区分中のA以外の不純物（表2参照）

非共軛化合物においてはI区分の屈折率が最も高く，試料bでは n_D^{40} 1.5010 であつた。この値は鎖状炭化水素の中で屈折率の高いスクアレンの屈折率 (1.4890)[6] より更に高いもので，環状の炭化水素の存在が考えられる。

中宮[8] はイシナギおよびスケソウのA濃縮物の無水マレイン酸非作用部から屈折率 1.5 以上の不飽和炭化水素を分離し Gadusene と命名している。中宮および著者等の分離した屈折率の高い炭化水素はA濃縮物に広く存在するらしいが，これらの炭化水素の構造についてはなお，確認されていない。

また試料bの分子蒸溜々分により得られた非共軛化合物の屈折率は試料bのそれよりもやや低く，I区分の屈折率は 1.4868 である。従つて非共軛化合物中の屈折率高き炭化水素も分子蒸溜によつて除かれることが明かとなつた。

摘　　要

A濃縮物を更に精製する方法を検討するため，濃縮物のアルミナによるクロマト区分及び無水マレイン酸附加物の除去などを行い次のことを明かにした。

1) A濃縮物をクロマトにより3区分に分離し，各区分の不純物の割合を求めた結果，不純物はI区分＞II′区分＞III区分の順に存在する。

2) A濃縮物中の不純物の過半は非共軛化合物であり，その赤外部吸収より，グリセリール・エーテルの存在を推定した。

3) A濃縮物およびその非共軛化合物をクロマト区分して，その屈折率を測定した結果，濃縮物においてはII区分が，非共軛化合物においてはI区分が最も高い屈折率をポした。また分子蒸溜によつて得られた溜分の屈折率はもとの試料の屈折率よりも低い。

4) 濃縮物アセテートの分子蒸溜は Oser f の向上および色，臭味の軽減などA濃縮物の精製に有効な操作である。

本研究に当り終始御懇篤なる御指導を賜つた東秀雄博士ならびに御助言を頂いた衣巻農輔技官に謝んで感謝の意を表する。

文　　献

1) N. I. GRIDGEMAN, G. P. GIBSON and J. P. SAVAGE: *Analyst* **73**, No. 873, 662 (1948).
2) 東秀雄・金子徳五郎・杉井麟三郎: 本誌, **18**, No. 9, 397 (1953).
3) 中宮次郎: 理研報, **13**, No. 1, 56 (1934).
4) J. G. BAXTER and C. D. ROBESON: *J. A. C. S.* **64**, 2,415 (1942).
5) 阿河利男・辻本純三・小森三郎: 工化, **59**, No. 4, 460 (1956).
6) 東秀雄・金子徳五郎・杉井麟三郎: 本誌, **21**, No. 6, 448 (1955).
7) 東　秀雄: 農化, **17**, 813 (1941).
8) 中宮次郎: 理研報, **14**, No. 11, 720 (1935).

天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究—IX.

メタノールを使用してA濃縮物を精製する方法

東 秀雄・山川健重・金子徳五郎・杉井麒三郎

(1959 年 2 月 27 日受理)

STUDIES ON THE ECONOMICAL MANUFACTURE OF VITAMIN A CONCENTRATE FROM FISH LIVER OIL—IX.

PURIFICATION OF VITAMIN A CONCENTRATE WITH METHANOL.

Hideo Higashi*, Takeshige Yamakawa*, Tokugorô Kaneko*
and Kisaburô Sugii*

In succession to the previous experiments on this subject, technological improvement has been saught to concentrate vitamin A to a higher level and free from odor. In the present work a method for treating vitamin A concentrate with aqueous methanol under specific conditions has been successful in eliminating fishy smell as well as hydrocarbon from the previous product. The color of the refined substance was found improved to some extent.

Therefore, the method may be recommended as an approach to industrially refining vitamin A concentrate at a reduced cost. The following are the procedures of and the results from the experiments.

1) Different amounts and strengths of methanol were added to each sample of vitamin A concentrate shown in Table 1. The mixture was boiled until the solution was formed. After cooling over night, separated methnol soluble fraction was decanted and evaporated. Vitamin A was concentrated in this fraction, while vitamin D in another insoluble with methanol (Tables 2, 4 and 8).

2) Of the various procedures compared as to the refining efficiency, the most effective was found to be a twice-repeating treatment (**a** method) with 90% methanol 20 times as much as the vitamin A sample—the second treatment extracting the vitamin A from the residue of the first—(Table 3).

3) In determining the effect of the vitamin A material from different species of fish, **a** method was compared with **b** in which petroleum ether solution was extracted with methanol. Although the results were somewhat variable depending on the samples, the recovery of the vitamin A concentrate was greater in **a** method than in **b**, while the rate of concentration was *vice versa* (Table 5).

4) The methanol soluble fraction obtained by both methods was subjected to chromatographic determination with a view to separating the material into three fractions as it was chromatographed in the alumina column. Upon measuring the weights and vitamin A levels of the eluted fractions it was revealed that the components of impurities to be eliminated were variable even in the same procedure likely depending on species of fish used for the vitamin A sample (Tables 6, 7 and Fig. 1).

5) Vitamin D was separated at a high level in the methanol insoluble fraction (Table 8). It is suggested, therefore, that the method with some improvement may be adopted for separating the liveroil of some species into vitamin A and vitamin D.

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab. Chūō-ku, Tokyo, Japan).
東海区水産研究所業績 B 第 311 号.

緒　　言

ビタミン油からA濃縮物を製造するために不鹸化物を有機溶剤で処理してAを濃縮する試みは古くから行われている[1),2)]。これらの濃縮法はA濃縮物を工業的に精製する方法として採用し得るか否かは明らかにされていない。本研究で既に述べた濃縮法[3),4)]のみでは原料によつては希望するA濃度に達せず，しかも製品の香味もよくない場合もあるので，これらの濃縮法によつて得られたA濃縮物を更に精製する必要を感じた。既報の濃縮法で得られたA濃縮物にはなお相当多量の炭化水素，アルコール類，分解物等の不純物が含まれる。これらの不純物をA濃縮物より分離する手段としてA濃縮物を有機溶剤で処理する濃縮法（精製法）について吟味することにした。本報ではA濃縮物を含水メタノールで処理する方法について吟味した結果を報告する。

実　験　の　部

I. 試　料

スケソウを原料とした第1次濃縮物*およびスケソウ，ヨシキリザメ，カツオを原料とした第2次濃縮物**を試料とした。これらのA単位は Table 1 に示す。

Table 1.　試　料
Sample used in the experiment.

試料番号 Sample No.	ビタミン単位 Vitamin potency A ($\times 10^4$ I. U.)	D	備考 Remarks
1	35.2		スケソウ肝油第1次濃縮物 Concentrated from pollack liveroil by the first treatment.*
2	110.0		スケソウ肝油第2次濃縮物 Concentrated from pollack liveroil by the second treatment.**
3	96.0		カツオ肝油第2次濃縮物 Concentrated from skipjack liveroil by the second treatment.
4	134.0		マグロ肝油第1次濃縮物 Concentrated from tuna liveroil by the first treatment.
5	77.9		ヨシキリザメ肝油第2次濃縮物 Concentrated from great blue shark liveroil by the second treatment.
6	105.0		スケソウ肝油第2次濃縮物 Concentrated from pollack liveroil by the second treatment.
7	80.5	264.8	カツオ肝油第2次濃縮物 Concentrated from skipjack liveroil by the second treatment.

* First treatment comprises extraction after saponification and precipitation with cooled methanol.
** Second treatment comprises the first treatment mentioned above and the removal of impurities by the urea complex formation.

II. 実験方法

試料 5～10g を精秤し，これに種々の量，濃度のメタノールを加えて加温溶解せしめ，一夜冷蔵庫中に冷却し，上澄液を傾瀉してとり，その溶剤を溜去後メタノール可溶物の重量ならびにA（試料によつては A および D[5)]）を測定した。また，メタノール不溶部についても重量，吸光度を測定した。使用するメタノールは純メタノールに水を加えて諸種の濃度に調製した。

III. 実験結果および考察

試料を適当濃度のメタノールに溶解せしめ，冷却すればA以外の不純物は主としてメタノール不溶部に来り，メタノール可溶部は試料よりもA濃度が高くなる。このさい，使用するメタノール濃度および量あるいは試料によつてAの濃縮効果は当然異ることが予想されるので使用すべきメタノールの濃度，量および試料による差異などを吟味することにした。

（1）メタノール濃度に関する吟味

試料 (1) を 10 倍量の 85～95% メタノールに溶解させ上述の実験方法に従つてメタノール可溶部と不溶

* 鹸化法で得た不鹸化物を脱ステロールしたもの。
** 第1次濃縮物を更に尿素処理したもの。

部に分ち，両者の重量およびAを測定し，Table 2 のごとき結果が得られた。Table 2 に見るごとく，メタノール濃度が低くなるに従つて，メタノール可溶部のA濃度は高くなるが，A収量は低下する傾向がある。この結果より溶剤を試料に対し10倍量使用せる場合はメタノール濃度は 87.5, 90% が適当と思われた。試料 (1) を 87.5, 90 %メタノール反復抽出し，その抽出部のA濃度およびA収量を測定し Table 3 のごとき結果が得られた。

Table 3 に見るごとく，メタノール可溶部のA濃度は 87.5% メタノールを使用した場合が，A収量は 90% メタノールを使用した場合がそれぞれよい結果を示している。

Table 2. メタノールの濃度を変えた場合
Extracting with various strength of methanol.
試料 1
Sample No. 1

メタノール濃度 Strength of methanol	部分 Fraction	重量 Weight (%)	A単位 Vitamin A potency	濃縮率 Rate of concentration	A収量 Yield of vitamin A (%)
95%	可溶部 Soluble fraction	74.5	×10⁴ I.U. 39.8	1.13	84.2
	不溶部 Insoluble fraction				
92.5%	可溶部 Soluble fraction	37.8	51.4	1.46	55.1
	不溶部 Insoluble fraction	62.6	24.3	0.69	43.4
90%	可溶部 Soluble fraction	26.3	57.5	1.63	42.9
	不溶部 Insoluble fraction				
87.5%	可溶部 Soluble fraction	16.6	65.9	1.87	31.0
	不溶部 Insoluble fraction	85.8	28.5	0.81	69.7
85%	可溶部 Soluble fraction	12.1	64.8	1.84	22.3
	不溶部 Insoluble fraction				

Table 3. メタノールで濃縮物を反復抽出した場合
Extracting A concentrates with methanol repeatedly.
試料 2
Sample No. 2

メタノール濃度 Methanol strength	90%							
	可溶部 Soluble fraction				不溶部 Insoluble fraction			
抽出回数 No. of times of extracting	重量 Weight (%)	A単位 Vitamin A potency	A濃縮率 Rate of concentration	A収量 Yield of vitamin A (%)	重量 Weight (%)	A単位 Vitamin A potency	A濃縮率 Rate of concentration	A収量 Yield of vitamin A (%)
1	77.9	×10⁴ I.U. 121.0	1.10	85.5	21.7	×10⁴ I.U. 62.7	0.57	12.5
2	3.1 (81.0)	145.2 (122.1)	1.32 (1.11)	4.1 (89.6)	17.5	48.4	0.44	7.7

メタノール濃度 Methanol strength	87.5%							
	可溶部 Soluble fraction				不溶部 Insoluble fraction			
抽出回数 No. of times of extracting	重量 Weight (%)	A単位 Vitamin A potency	A濃縮率 Rate of concentration	A収量 Yield of vitamin A (%)	重量 Weight (%)	A単位 Vitamin A potency	A濃縮率 Rate of concentration	A収量 Yield of vitamin A (%)
1	48.2	×10⁴ I.U. 144.0	1.31	63.1	52.4	×10⁴ I.U. 69.3	0.63	33.2
2	7.8 (56.0)	157.1 (146.2)	1.43 (1.33)	11.1 (74.2)	43.7	53.8	0.49	21.2
3	4.5 (60.5)	132.0 (145.0)	1.20 (1.32)	5.4 (79.6)	38.7	50.6	0.46	17.8

( ) 内は累計を示す。
The values enclosed in parentheses show the sum of pertinent items.

（2） メタノール使用量の吟味

試料 (2) を 10～50 倍量の 90% メタノールに溶解し上述の実験方法に従つてメタノール可溶部と不溶部に分ち，両者の重量およびA濃度を測定した結果を Table 4 に示す。可溶部のA収量はメタノールを多量に使用した場合が当然多くなるが，メタノール使用量を余り多くすれば不純物の溶解量も多くなつて可溶部のA濃縮率は下つてくる。この表によるとメタノール使用量が 20 倍程度が効果的に見えるが，原料の種類によつては多少増減した方が効果的な場合もあろう。

Table 4. メタノール可溶部における重量および A 単位
Weight and vitamin A potency of methanol soluble fraction extracted with various volumes of methanol.

試料 2
Sample No. 2

メタノール量(倍) Volume of methanol (Times of sample)	重量 Weight (%)	A 単位 Vitamin A potency	A 濃縮率 Rate of concentration	A 収量 Yield of vitamin A (%)
		$\times 10^4$ I. U.		
10	39.8	130.0	1.18	47.0
15	49.1	131.0	1.19	58.5
20	55.3	134.0	1.22	67.4
30	59.2	131.4	1.19	71.2
50	71.7	124.0	1.13	81.5

（3） 原料の差による精製効果の差異

原料によつて使用すべきメタノールの濃度および量の適量は違うだろうが，上の実験では 20 倍量の 90% メタノールにより2回くり返し抽出を行つた場合が好結果であるように思えたので試料 (3), (4), (5), (6) について 20 倍の 90% メタノールで2回処理して原料の差による精製効果の差異を検してみた。このさい参考のために上述のメタノール処理による精製法（以下a法と仮称する）と同時に石油エーテルおよびメタノールを使用する精製法*（以下b法と仮称する）による精製を行い，それらの精製効果を比較した。これらの結果をとりまとめ Table 5 に示す。Table 5 に見るごとく，試料により精製効果は多少の差があるが，可溶部のA収量の大きい点でa法がまさり，可溶部のA濃度を高める点ではb法がまさつている。a 法により得られた可溶部およびb法により得られたメタノール可溶部につき，前報[6]のアルミナクロマトを行い，各々3区に分ち，それらの区分の重量およびA濃度を測定した。これらの結果を Table 6 および Table 7 に示す。これらの表に見るごとく，原料の種類，精製法によつて精製効果が異ることが分る。すなわち，a 法によりI区分をよく除去出来る試料はヨシキリザメ，カツオ，マグロで，III区分をよく除去出来る試料はマグロである。また，b法によりI区分をよく除去出来る試料はマグロ，スケソウ，ヨシキリザメ，カツオで，III区分をよく除去できる試料はマグロ，スケソウである。

このように，同じ精製法によつても除かれる不純物の性質が異るが，これら不純物の性質の一部を明らかならしめるため，クロマト区分の重量比を面積で示したのが Fig. 1 である。クロマト区分のI区分は OH を有しない化合物で，III区分は OH 2ケを有するもの，あるいは分解物などであろう。

上述のメタノールを使用してA濃縮物を精製する方法によれば魚種によりA濃度が4割も濃い濃縮物をA収量をあまり落さずに得ることができ，しかも得られた濃縮物は不快臭味が少く，色調がよくなる。この精製法はA濃縮物をさらに精製して天然A結晶とする場合にも有効な工程と考えられ，したがつて，A濃縮物の経済的濃縮法の一環として，この精製法は十分採用し得ると思う。

* 試料を2倍量の石油エーテルに溶解後，5倍量宛の 90% メタノールで5回抽出をくり返し，メタノール可溶部と石油エーテル可溶部とに分離する方法。

Table 5. メタノール処理とメタノール，石油エーテル処理との比較
Refining efficiency of **a** method compared with that of **b** method.

方法 Method / 試料番号およびA単位 Sample No. and vitamin A potency	a 法 a method					b 法 b method				
	部分 Fraction	重量 Weight (%)	A単位 Vitamin A potency	A濃縮率 Rate of concentration	A収量 Yield of vitamin A (%)	部分 Fraction	重量 Weight (%)	A単位 Vitamin A potency	A濃縮率 Rate of concentration	A収量 Yield of vitamin A (%)
3 960,000 I.U.	可溶部 Soluble fraction	76.8	×10⁴ I.U. 107.5	1.12	86.3	メタノール可溶部 Methanol soluble fraction	62.4	×10⁴ I.U. 123.8	1.29	80.5
	不溶部 Insoluble fraction	21.4	28.8	0.30	6.3	石油エーテル可溶部 Petroleum ether soluble fraction	36.7	42.2	0.44	15.9
	計 Total	98.6			92.6	計 Total	99.1			96.4
4 1,340,000 I.U.	可溶部 Soluble fraction	70.6	177.0	1.32	93.3	メタノール可溶部 Methanol soluble fraction	46.5	206.5	1.54	71.5
	不溶部 Insoluble fraction	28.0	30.8	0.23	6.3	石油エーテル可溶部 Petroleum ether soluble fraction	52.6	64.3	0.48	25.1
	計 Total	98.6			99.6	計 Total	99.1			96.6
5 779,000 I.U.	可溶部 Soluble fraction	59.7	109.0	1.40	83.4	メタノール可溶部 Methanol soluble fraction	52.4	115.3	1.48	77.4
	不溶部 Insoluble fraction	34.5	23.4	0.30	10.5	石油エーテル可溶部 Petroleum ether soluble fraction	43.5	36.6	0.47	20.2
	計 Total	94.2			93.7	計 Total	95.9			97.6
6 1,050,000 I.U.	可溶部 Soluble fraction	69.8	120.7	1.15	80.4	メタノール可溶部 Methanol soluble fraction	54.5	135.5	1.29	70.3
	不溶部 Insoluble fraction	28.8	51.4	0.49	14.1	石油エーテル可溶部 Petroleum ether soluble fraction	44.4	65.1	0.62	27.6
	計 Total	98.6			94.5	計 Total	98.9			97.9

Table 6. クロマト区分の重量
Weight of alumina chromatographic fraction.

試料番号 Sample No.	供試料 Sample used	重量 Weight (%) クロマト区分 Chromatographic fraction I *	I **	II *	II **	III *	III **
	c.	29.0	100	40.3	100	30.7	100
	a. s.	8.6		35.3		32.9	
3	a. i.	20.4	70.3	5.0	12.4		
	b. m. s.	13.4		32.1		16.9	
	b. p. s.	15.6	53.8	8.2	20.4	13.8	45.0
	c.	21.4	100	69.9	100	8.7	100
	a. s.	10.5		59.0		1.1	
4	a. i.	10.9	50.9	10.9	15.6	7.6	87.3
	b. m. s.	3.7		39.3		3.5	
	b. p. s.	17.7	82.7	30.6	43.8	5.2	59.8
	c.	28.2	100	48.5	100	23.3	100
	a. s.	6.7		32.8		20.2	
5	a. i.	21.5	76.3	15.7	32.4	3.1	13.3
	b. m. s.	9.0		31.4		12.0	
	b. p. s.	19.2	63.1	17.1	35.3	11.3	48.6
	c.	30.8	100	47.7	100	31.5	100
	a. s.	15.8		36.7		17.3	
6	a. i.	15.0	48.8	11.0	23.1	14.2	45.2
	b. m. s.	8.9		30.4		15.2	
	b. p. s.	21.9	71.1	17.3	36.3	16.3	51.7

* クロマトにかける前の無処理試料に対する重量比
Weight percent of control before chromatography.
** 除去部分の割合
Ratio of eliminated part. (%)

Table 7. クロマト区分の濃度およびA収量
Vitamin A potency and yield of chromatographic fraction.

試料番号 Sample No.	供試料 Sample used	ビタミンA単位 Vitamin A potency クロマト区分 Chromatographic fraction I	II	A収量 Yield of vitamin A (%) クロマト区分 Chromatographic fraction I	II
		$\times 10^4$ I. U.			
	c.	11.5	176.3	3.5	74.0
3	a. s.	17.3	201.5	2.0	85.8
	b. m. s.	18.9	191.5	3.3	79.5
	c.	22.5	159.0	5.0	83.0
4	a. s.	53.8	162.0	4.7	79.0
	b. m. s.	44.6	201.5	1.7	82.6
	c.	15.8	135.3	5.7	83.5
5	a. s.	26.1	178.0	2.6	86.5
	b. m. s.	20.7	165.4	3.1	86.1
	c.	34.0	183.0	10.0	83.1
6	a. s.	23.8	189.8	4.3	80.0
	b. m. s.	23.8	192.0	2.9	79.1

c. 対照
Control.
a. s. a法による可溶部
Soluble fraction by **a** method.
a. i. a法による不溶部
Insoluble fraction by **a** method.
b. m. s. b法によるメタノール可溶部
Methanol soluble fraction by **b** method.
b. p. s. b法による石油エーテル可溶部
Petroleum ether soluble fraction by **b** method.

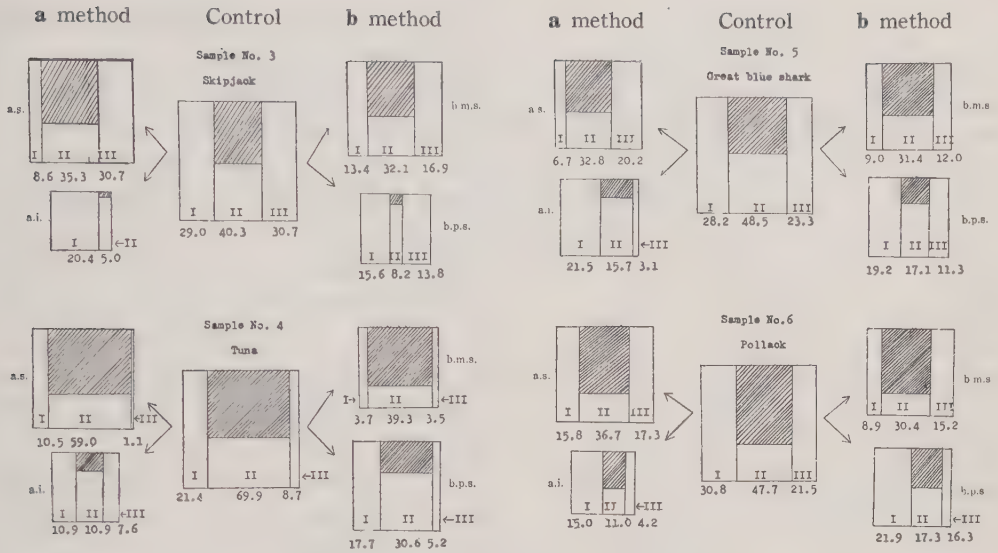


Fig. 1. クロマト区分の重量比
Isometric representation of weight ratio of chromatographic fractions I, II, and III.
斜線部分はビタミンAを示す　数字は対照に対する重量比を示す　その他の略号は Table 6 および 7 の註参照
Hatched part: Vitamin A　The numerals beneath each panel show the weight ratio based on the control used.　See note of Tables 6 and 7 for the other notations.

Table 8. メタノール処理によるAとDの分離
Separation of vitamin D by methanol treatment.
試料 7
Sample No. 7

抽出回数 No. of times of extracting	可溶部 Soluble fraction						
	重量 Weight (%)	A単位 Vitamin A potency	A濃縮率 Rate of concentration of A	A収量 Yield of vitamin A (%)	D単位 Vitamin D potency	D濃縮率 Rate of concentration of D	D収量 Yield of vitamin D (%)
1	35.6	$\times 10^4$ I.U. 91.0	1.13	40.3	$\times 10^4$ I.U. 104.8	0.40	14.3
2	17.6 (53.2)	91.8 (91.2)	1.14 (1.13)	20.1 (60.4)	191.2	0.72	12.7 (27.0)
3	10.2 (63.4)	75.8 (88.5)	0.94 (1.10)	9.6 (70.0)	251.2	0.95	9.7 (36.7)
抽出回数 No. of times of extracting	不溶部 Insoluble fraction						
	重量 Weight (%)	A単位 Vitamin A potency	A濃縮率 Rate of concentration of A	A収量 Yield of vitamin A (%)	D単位 Vitamin D potency	D濃縮率 Rate of concentration of D	D収量 Yield of vitamin D (%)
1	62.7	$\times 10^4$ I.U. 63.2	0.79	49.5	$\times 10^4$ I.U. 335.6	1.27	79.7
2	40.0	56.2	0.70	28.0	464.0	1.75	70.0
3	29.0	49.5	0.62	18.0	489.2	1.85	53.6

( ) 内は累計を示す。
The values enclosed in parentheses show the sum of pertinent items.

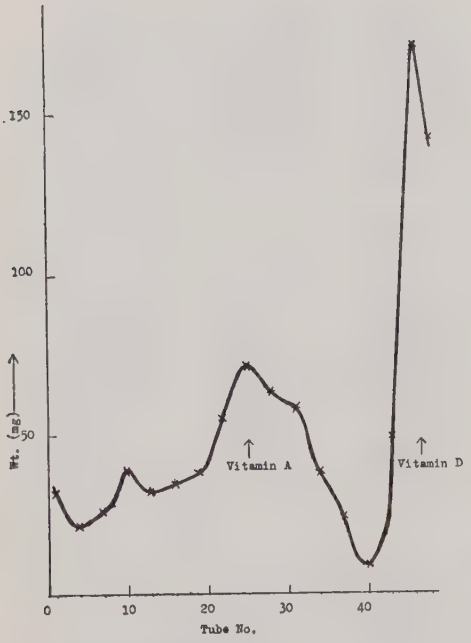


Fig. 2. 向流抽出法によるAとDの分離
The application of countercurrent method to the fractionation of vitamins A and D from methanol insoluble fraction in method **a**.
溶媒系　石油エーテル－90%メタノール
Solvent system: Petroleum ether－90% methanol
溶剤の容積比
Volume ratio of upper to lower phase: 1/1

（4） メタノールによりA濃縮物よりDを分離する試み

予備試験によりA濃縮物をメタノールで処理すれば可溶部はDの含量が低いことが分つたのでメタノール処理法を工夫すればAとDとの分離も可能と考えたのでメタノール処理によるAとDとの分離条件を吟味することにした。

試料(7)を10倍量の90%メタノールでくりかえし3回抽出した結果をTable 8に示す。Table 8に見るごとく，メタノール可溶部のA濃度は試料の1.1倍となり，そのA量は70%に相当する。また，メタノール不溶部のD濃度は試料の1.85倍となり，そのD量は53.6%に相当する。

メタノール処理によつてメタノール可溶部のD濃度が低くなり，不溶部のDが濃くなることは分つたが，この程度の分離ではまだ不十分であるが，メタノール濃度，使用量をかえればもつとよいAとDの分離ができそうである。また，Dが相当濃くなつたメタノール不溶部に二種の溶剤を用いる向流抽出法を行えば，更にAとDを完全に分けることができよう。参考のために小型向流分配装置でAとDの分離を試みた1例をFig. 2に示す。

従来，A濃縮物中のDはほとんど評価されなかつたけれども，今後Aと同時にDを分離するように研究を発展させればカツオ，マグロ肝油などD濃度の高い資源の利用に寄与することができる。

摘　　要

A濃縮物を適当濃度のメタノールに加温溶解し，後冷却し析出する沈澱部を除去すれば，着色物，有臭物，炭化水素などが相当除かれたA濃縮物が得られる。

この方法はA濃縮物の経済的精製法として採用し得ることおよびAとDとの分離にも有効であることを指摘した。

文　　献

1) Hoffman-La Roche and Co.: *British P.* 393,883 (1933).
2) 川上行蔵：農化誌，**9**，1,206 (1933).
3) 東　秀雄・新間彌一郎・衣巻豊輔・山川健重：特許 236,031 (1957).
4) 東　秀雄・山川健重・衣巻豊輔：本誌，**20**，557 (1957).
5) 沼田克彦：ビタミン，**11**，444 (1956).
6) 新間彌一郎・田中　稔：本誌，**25**，52–58 (1959).

天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究—X.

弱化酸性白土を使用するビタミンA濃縮物の精製法

東　秀雄・金子徳五郎・杉井麒三郎
山川健重・井関重夫

日本水産学会誌
第二十五巻　第三号　別冊
昭和三十四年七月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 25, No. 3, July, 1959.

天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究—X.

弱化酸性白土を使用するビタミンA濃縮物の精製法

東　秀雄・金子徳五郎・杉井麒三郎
山川健重・井関重夫

(1959 年 4 月 14 日受理)

STUDIES ON THE ECONOMICAL MANUFACTURE OF VITAMIN A CONCENTRATE FROM FISH LIVER OIL—X.

ADSORPTION BY WEAKENED ACID CLAY

Hideo Higashi, Tokugoro Kaneko, Kisaburo Sugii,
Takeshige Yamakawa and Shigeo Iseki*

In usual methods for refining a vitamin A concentrate (hereinafter referred to as the sample), vitamin A is more or less liable to be destroyed as it is subjected first to adsorption to separate impurities and then to elution before obtaining a higher concentrate.

In search of technological improvement it occurred to the authors that acid clay, when weakened appropriately, could be economically used as an adsorbent of impurities so as to avert the destruction of vitamin A.

In the experiments a definite amount of aquatic solution of ammonia, urea or NaOH was added to acid clay. The mixture was dried, pulverised, and then heated at a certain temperature. The acid clay thus weakened was used as the material adsorbing impurities from the sample.

Two methods were employed in adsorbing impurities of the sample into the weakened acid clay; one was a normal column chromatography and the other was shaking or stirring.

The results of the experiments were as follows:

1) Under certain condition, it had been possible to concentrate vitamin A by the use of acid clay weakened with ammonia or urea (Tables 1 and 2). Nevertheless, further experiments proved that a constant activity could not be secured in these adsorbents.

2) When weakened with NaOH, however, acid clay showed a constant activity in removing a part of the impurities from the sample together with fishness and dark color. The best result was obtained when the weakened acid clay containing 3.5% NaOH was heated at 150°C and used at the rate of 20 parts to 1 part of the sample. Along with this adsorbent the shaking or stirring method is recommended to be most economical and practical for industrial purposes (Tables 3～8).

3) With view to examining the refining efficiency, the compositions of the sample before and after carrying out the adsorption were determined on the basis of alumina chromatographic fractionation, and the results were compared as in Fig. 1 and Table 9. The weakened acid clay was capable of adsorbing entirely fraction III consisting only of the impurities. In fraction II which consisted of the impurities and vitamin A, both equally adsorbable to alumina, a greater part of the former was adsorbed by the weakened acid clay.

4) *Kanuma* earth (a kind of clay used in gardening) weakened by KOH was also as effective as the NaOH weakened acid clay in adsorbing impurities (Table 10).

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab. Chūō-ku, Tokyo, Japan).

東海区水産研究所業績 B 第 313 号

緒　　言

前報までに述べた方法[1),2)]で製造した不鹸化物（以下A濃縮物と称する）にはなおビタミンA（以下単にAという）以外の不鹸化物（以下不純物と称する）が相当含まれている。

著者らはこれらのA濃縮物より不純物を吸着法により除去しようと試みた。

吸着法によりAを濃縮するには吸着剤にAを吸着せしめて，吸着しない不純物を除いて後，Aを溶出して濃縮する方法[3),4),5)]が行われている。この方法では操作中にAの分解が起り易く，また使用溶剤が多元的となるため経済的濃縮法としては採用し難い。

Aを一旦吸着せしめて溶出する際のAの損失は吸着剤とAの反応による分解，操作中における酸化などが考えられるが，今までAの損失を少からしめるためにとられた主な方法は不活性ガス中における操作と吸着剤の適当なる弱活性化（以下単に弱化という）である。例えばアルミナ[6)]，Floridin earth[7)] など[8)]を弱化してAの吸着分離に応用している。しかしこれら弱化した吸着剤を用いる方法も上述のように一旦Aを吸着させるという考えに基いたものである。

弱化した吸着剤を用い，単一溶剤でAを吸着せしめることなく不純物のみを吸着除去しAを濃縮，精製することは従来行われていない。安価な吸着剤を用い，単一溶剤でAを濃縮，精製出来れば経済的A濃縮法の一工程として実用化することができる。使用すべき吸着剤としては，本邦に多産する酸性白土を弱化したものを主に吟味した。この結果適当な条件で弱化した酸性白土を適量使用することによりA濃縮物のA濃度の向上および，におい，味，色調の改善が経済的に行いうる確信がえられたのでここに報告する。

実　験　の　部

（I）試　　料

試料としたA濃縮物は，ビタミン油を分子蒸溜後，メタノール性ソーダで鹸化し，ベンゼンにより不鹸化物を抽出し，不鹸化物よりステロールおよび尿素附加物を除いたものおよびこのA濃縮物をさらにメタノールで処理[9)]して不溶物を除いたものである。

（II）実験方法

（1）吸着剤の弱化方法

従来，吸着剤を弱化する方法としてはアルミナに水を加える方法[6)]，Floridin earth にアンモニアを作用せしめる方法[7)]などが知られている。著者らはベンゼン溶液中でAを吸着させぬ程度に弱化した吸着剤を酸性白土などを用いて調製した。この実験に用いた弱化吸着剤の製法を以下に述べる。

i）アンモニアによる弱化方法

60～120 mesh に粒を揃えた酸性白土をガラス管につめ，乾燥したアンモニアガスを 10 分間通じるか，あるいは一定量のアンモニア水に漬けてから乾燥する。

弱化酸性白土（以下弱化白土という）を使用前に一定温度で 15 分間加熱する。

ii）尿素による弱化方法

酸性白土に一定量の尿素の水溶液を加えて混和し，乾燥後 60～120 mesh に粒を揃える。この乾燥粒を一定温度で 15 分間加熱して使用する。その場合加熱温度が約 140°C になると急激にアンモニアが発生する。

iii）苛性ソーダによる弱化方法

酸性白土に一定量の苛性ソーダ水溶液を加えてよく混和し，乾燥後 60～120 mesh の粒を揃えるかあるいは 120 mesh 以下に粉砕し一定温度で 15 分間加熱する。

iv）苛性カリによる弱化方法

鹿沼土に対し 10% の苛性カリの水溶液を適量加えて混和，乾燥後 25～60 mesh に粒を揃え 150～160°C で 10 分間加熱する。

(2) 吸着方法

吸着方法としては column を用いる chromatography (以下単にクロマト法という) と吸着剤を試料溶液中に分散せしめ，振盪あるいは攪拌後吸着剤と溶液とを分離する方法 (以下単に分散吸着法という) の2通りを試みた。

i) クロマト法

予め試料約 0.2 g (精秤) を適量のベンゼンに溶解させて置き，別にガラス綿を詰めた column の底部を指頭にて押え，column 内にベンゼン，ついで粒を揃えた吸着剤を所定量入れて column を受器に接続し，column 内の溶剤が落下して吸着剤の上部に僅かに残つているとき，試料のベンゼン溶液を column 内に注入し，所定量のベンゼンを用いて洗滌する。洗滌終了後，受器内の溶剤を溜去すれば目的とする濃縮物を得る。

ii) 分散吸着法

この方法は吸着剤を濃縮物のベンゼン溶液中に投入して，攪拌または振盪後，沪過，洗滌し，沪液，洗液を合してベンゼンを溜去し，目的とする濃縮物を得る。

これらの吸着実験に用いたベンゼンは脱水，精製したものである。酸性白土は水沢化学株式会社製工業用を，鹿沼土は園芸用の市販品を用いた。

(III) 実験結果および考察

(1) アンモニア弱化白土および尿素弱化白土による吸着試験

シュモクザメ肝油より製したA濃縮物を試料とし，アンモニア弱化白土によるクロマト法を行つた (Table 1)。Table 1 に見るように吸着剤の加熱温度を比較すると 140°C の場合が収量，濃縮比共に良好である。

吸着操作の際，アンモニア弱化白土はA濃縮物のベンゼン溶液と接触して茶褐色を呈する。

調製日の異なる弱化白土の吸着試験を同一試料，同一条件で行つたが，Aの濃縮比，収量に 20～30% の差があり，再現性がない。この結果から見るとアンモニアによる弱化は著者らの実験条件では一定に行なわれ難いようである。

尿素弱化白土はアンモニア弱化白土に較べて弱化程度を一定にしやすいと考え，イシナギ肝油より製したA濃縮物を試料とし，尿素弱化白土によるクロマト法を行つた。その結果を Table 2 に示す。

Table 1. アンモニア弱化酸性白土使用前の加熱温度とA濃縮比，A収量との関係
Comparison of heating temperatures of ammonia weakened acid clay with ratio of concentration and yield of vitamin A.

使用前の加熱温度 Temp. (°C)	非吸着物 Unadsorbed matter			
	重量 Wt. (%)	A単位(万) Vitamin A potency × 10^4	濃縮比 Ratio of conc.	A収量 Vitamin A yield (%)
100	88.7	165.4	1.07	94.5
140	83.1	179.9	1.16	96.3
180	75.3	176.3	1.14	86.2

吸着剤 Adsorbent: アンモニア弱化酸性白土 2 g Acid clay weakened by ammonia 2 g
試料 Sample : イシナギ肝油濃縮物 Liver oil concentrates of Black sea bass ca. 0.2 g. Vitamin A unit, 1,550,000 u.s.p.u.
溶剤 Solvent : Benzene 20 cc

Table 2. 尿素弱化酸性白土使用前の加熱温度とA濃縮比，A収量との関係
Comparison of heating temperature of urea-weakened acid clay with ratio of concentration and yield of vitamin A.

使用前の加熱温度 Temp. (°C)	非吸着物 Unadsorbed matter			
	重量 Wt. (%)	A単位(万) Vitamin A potency × 10^4	濃縮比 Ratio of conc.	A収量 Vitamin A yield (%)
100	76.8	189.0	1.04	80.3
120	77.5	190.0	1.05	81.4
140	83.8	206.0	1.14	95.4
160	76.5	206.0	1.12	87.1

吸着剤 Adsorbent: 尿素弱化酸性白土 2 g Acid clay weakened by urea 2 g
試料 Sample : イシナギ肝油濃縮物約 0.2 g Liver oil concentrates of Black sea bass ca. 0.2 g. Vitamin A unit, 1,810,000 u.s.p.u.
溶剤 Solvent : Benzene 20 cc

吸着操作の際，アンモニア弱化白土と同様に尿素弱化白土もA濃縮物のベンゼン溶液と接すると茶褐色を呈する。

表に見るように吸着剤の加熱温度は 140°C がよい結果を示すが，アンモニア弱化白土と同様弱化が一定に行われない。上記のようにアンモニア弱化白土，尿素弱化白土ともにその活性を一定としにくいので実用化が困難と考えた。（本実験におけるA単位はすべて $E^{1\%}_{1cm}$ 325 mμ に 1900 を乗じたもので，補正はしていない。）

Table 3. 酸性白土の弱化に要する NaOH 量及び試料に対する弱化白土使用量の吟味
The volume of NaOH, and weakened acid clay related with concentration and yield of vitamin A.

弱化白土中の NaOH 量 NaOH in weakened acid clay (%)	試料に対する弱化白土使用量 Volume of weakened acid clay to sample	非吸着物 Unadsorbed matter 重量 Wt. (%)	A単位(力) Vitamin A potency ×10⁴	濃縮比 Ratio of conc.	A収量 Vitamin A yield (%)
3	×15	76.7	211.2	1.16	89.3
	×10	84.7	207.7	1.14	96.9
	× 6	86.6	201.8	1.11	96.4
	× 4	88.4	200.0	1.10	97.4
5	×15	82.7	206.8	1.14	94.3
	×10	85.1	206.7	1.12	95.4
	× 6	90.7	195.0	1.08	97.5
	× 4	90.2	195.0	1.08	97.1
7	×15	84.8	199.2	1.10	93.1
	×10	90.7	188.9	1.04	94.3
	× 6	93.6	190.1	1.05	98.1
	× 4	94.5	182.1	1.00	95.0

試料 Sample: アブラガレイ濃縮物約 0.2 g
Liver oil concentrates of Arrow toothed flatfish ca. 0.2 g. Vitamin A unit, 1,815,000 u.s.p.u.
溶剤 Solvent: Benzene 20 cc.

Table 4. 酸性白土の弱化に要する NaOH 量の吟味
Various volumes of NaOH in weakened acid clay.

試料(A単位) Sample used. (u.s.p.u.)×10⁴	酸性白土中の NaOH NaOH in acid clay (%)	非吸着物 Unadsorbed matter 重量 Wt. (%)	A単位(力) Vitamin A potency ×10⁴	濃縮比 Ratio of conc.	A収量 Vitamin A yield (%)
大ザメ Mixed shark (102.8)	3	67.7	124.9	1.22	82.2
	3.5	75.0	129.5	1.26	94.6
	4	72.5	129.1	1.26	91.2
	5	82.5	122.5	1.23	98.5
スケソウダラ Alaska pollack (102.0)	3	68.5	136.8	1.34	91.6
	3.5	73.6	135.8	1.34	98.1
	4	72.7	131.9	1.29	94.0
	5	79.8	126.3	1.24	99.0

試料 Sample: 試料はいづれも肝油濃縮物
Liver oil concentrates ca. 0.2 g.
溶剤 Solvent: Benzene 20 cc.

（2） 苛性ソーダ弱化白土の吸着試験

苛性ソーダ弱化白土による吸着の適当条件を求めるためクロマト法により，吸着試験を行つた。その結果を Table 3, 4 及び 5 に示した。

アブラガレイ肝油より製したA濃縮物について酸性白土の弱化に要する苛性ソーダの量，弱化白土の試料に対する使用量を吟味した結果 (Table 3) は，弱化白土の使用量は試料の 10～15 倍が適当であることがわかつた。苛性ソーダ使用量は 3 %の場合がよかつた。更に大ザメ及びスケソー肝油より得たA濃縮物について弱化に使用する苛性ソーダの量を吟味した結果 (Table 4), 3.5% が適当であつた。各種のA濃縮物のベンゼン溶液を苛性ソーダ弱化白土に接触させる場合，弱化程度により異なつた呈色をする。弱化程度が適当な時は，クロマト管の上層ははじめ淡緑色の帯状となり，この緑色帯はベンゼン溶液とともに下降し，徐々に褐色に変り，遂に全体が褐色となる。実さい，弱化の程度が適当であつたか否かは可検液がカラムの先端にふれた瞬間，分る。すなわち，弱化が不足であれば濃い青色を呈し，逆に過剰であれば褐色または呈色しない。すなわちこの場合に見られる呈色は弱化白土の活性の適否判別の指標となる。以上の実験結果から，酸性白土の弱化に使用する苛性ソーダの量は 3.5% が適当と思われたので以下の実験では 3.5%のアルカリで弱化した白土を使用した。

苛性ソーダ弱化白土を製造後，脱水及び活性の調整のために加熱する必要があるのでスケソウ肝油および

大ザメ肝油より得たA濃縮物について苛性ソーダ弱化白土を使用する前の加熱温度を吟味した (Table 5)。この表に見るように加熱温度は 150°C が適当なようである。

適当な条件で苛性ソーダ弱化白土を用いて不純物を除去することによりA濃縮物を収量よく濃縮，精製することができるが，クロマト法は工業的操作としては不適当である。そこで弱化白土を製造する際，60～120 mesh に粒を揃えず 120 mesh 以下の粉末とし，分散吸着法を行つた。この方法とクロマト法を3種のA濃縮物につき比較した結果 (Table 6) この2法による濃縮効果はほぼ同様であつた。

分散吸着法により大ザメおよびスケソウ肝油よりのA濃縮物を精製した結果 (Table 7) これらの試料では弱化白土を試料の 20 倍用いるのが適当と思われた。

これらの実験結果から，適当の条件において苛性ソーダ弱化白土でA濃縮物を吸着処理するとAを収量よく濃縮することができる。苛性ソーダ弱化白土は上記のアンモニア弱化白土，尿素弱化白土のように弱化条件を定めることが困難でなく再現性がある。しかも苛性ソーダ弱化白土は安価で，使用溶剤はベンゼンだ

Table 5. 3.5% NaOH 弱化白土，使用前の加熱温度
Various temperatures heating acid clay weakened with 3.5% NaOH

試料 A 単位 (万) Sample used (u.s.p.u.)×10⁴	加熱温度 Temp. (°C)	非吸着物 Unadsorbed matter 重量 Wt. (%)	A 単位 Vitamin A potency×10⁴	濃縮比 Ratio of conc.	A 収量 Vitamin A yield (%)
スケソウダラ Alaska pollack (98.5)	120	74.9	112.6	1.14	85.6
	150	75.2	120.8	1.23	92.5
	180	72.4	115.9	1.17	85.1
大ザメ Mixed shark (113.8)	120	75.2	136.1	1.20	90.2
	150	75.7	142.8	1.25	94.9
	180	74.8	138.1	1.22	91.0

吸着剤 Adsorbent: 3.5% NaOH 弱化白土 2g. Acid clay weakend with 3.5% NaOH 2g.
試料 Sample: いづれも肝油の濃縮物約 0.2g Liver oil concentrates ca. 0.2g.
溶剤 Solvent: Benzene 20 cc.

Table 6. クロマト法と分散吸着法との比較
Comparison of refining efficiency between chromatography and shaking method.

試料 A 単位 (万) Sample used (u.s.p.u.)×10⁴	方法 Method	非吸着物 Unadsorbed matter 重量 Wt. (%)	A単位(万) Vitamin A potency×10⁴	濃縮比 Ratio of conc.	A 収量 Vitamin A yield (%)
大ザメ Mixed shark (113.8)	(a)	75.6	142.8	1.25	94.9
	(b)	76.6	141.6	1.24	95.3
スケソウダラ Alaska pollack (102.1)	(a)	78.3	120.8	1.18	92.5
	(b)	80.4	119.0	1.17	93.7
クジラ Whale (155.1)	(a)	76.0	190.0	1.23	93.0
	(b)	78.6	188.4	1.21	94.9

吸着剤 Adsorbent: 3.5% NaOH 弱化白土 5g. Acid clay weakened with 3.5% with NaOH 5g.
試料 Sample: いづれも肝油の濃縮物約 0.5g. Liver oil concentrates ca. 0.5g.
溶剤 Solvent: Benzene 50 cc.
方法 Method: (a) クロマト法 Chromatography (b) 分散吸着法 Shaking method

Table 7. 分散吸着法による 3.5% NaOH 弱化白土の使用量の吟味
Various volumes of acid clay weakened with 3.5% NaOH in shaking method.

試料 A 単位 (万) Sample used (u.s.p.u.)×10⁴	試料に対する弱化白土の使用量 Volume of weakened acid clay to sample	非吸着物 Unadsorbed matter 重量 Wt. (%)	A単位(万) Vitamin A potency×10⁴	濃縮比 Ratio of conc.	A 収量 Vitamin A yield (%)
大ザメ Mixed shark (119.0)	×10	81.8	144.7	1.22	99.3
	×20	71.5	163.7	1.38	97.6
	×30	59.0	187.1	1.57	92.7
スケソウダラ Alaska pollack (120.0)	×10	78.0	152.0	1.27	98.7
	×20	72.5	157.3	1.31	94.8
	×30	63.4	167.0	1.39	87.6

吸着剤 Adsorbent: 3.5% NaOH 弱化白土 5g. Acid clay weakened with 3.5% NaOH 5g.
試料 Sample: 試料はいづれも肝油の濃縮物約 0.5g. Liver oil concentrates ca. 0.5g.
溶剤 Solvent: Benzene 50 cc.

けであるから，分散吸着法による精製は経済的A濃縮法の一つとして採用しうると考えられる。

苛性ソーダ弱化白土により精製されたA濃縮物は著しく脱色され，天然Aの最大欠点とされる不快な臭味

Table 8. 各種肝油よりのA濃縮物の 3.5% NaOH 弱化白土による吸着処理結果
Various liver oil concentrates refined by the 3.5% NaOH-acid clay adsorption.

試料 Sample			非吸着物 Unadsorbed matter			
魚種 Species		A単位(万) Vitamin A potency (u.s.p.u.)×10⁴	重量 Wt. (%)	A単位 (×10⁴) Vitamin A potency	濃縮比 Ratio of conc.	A収量 (%) Vitamin A yield
ナガスクジラ Fin whale	(a)	162.1	77.4	194.8	1.20	93.0
マッコウクジラ Sperm whale	(a)	158.6	76.2	198.0	1.25	95.1
アブラツノザメ Dogfish	(a)	164.2	74.6	196.6	1.20	89.3
	(c)	210.0	84.6	245.2	1.17	98.7
大ザメ Mixed shark	(a)	148.8	75.9	178.7	1.19	91.2
	(b)	143.5	72.6	182.3	1.27	92.2
	(c)	202.0	81.0	247.0	1.22	99.0
ヨシキリザメ Great blue shark	(a)	144.2	81.7	168.3	1.17	95.5
	(b)	92.4	77.0	117.8	1.28	98.2
	(b)	201.0	81.7	226.0	1.12	92.0
南方ザメ Southern shark	(a)	149.1	83.5	165.0	1.11	92.4
スケソウ，ヨシキリザメ混合 Mixture of Alaska pollack and Great blue shark	(a)	78.2	55.2	126.9	1.62	89.6
クジラ，シュモクザメ混合 Mixture of Whale and Hammer head shark	(a)	119.0	77.2	151.5	1.27	98.0
マグロ Tuna	(a)	181.3	78.5	223.2	1.23	96.5
	(c)	239.0	84.1	260.2	1.09	91.7
メカジキ Sword fish	(a)	127.9	72.1	174.0	1.36	98.0
カジキ Marlin	(b)	146.1	67.6	208.2	1.42	96.4
キハダマグロ，メバチ混合 Mixture of Yellow fin and Big eye tuna	(a)	144.1	74.4	177.0	1.23	91.3
大モノ Mixture of Tuna	(a)	96.4	61.9	153.1	1.59	98.5
カツオ Skipjack	(a)	73.3	90.0	77.0	1.05	94.8
スケソウダラ Alaska pollack	(a)	98.5	75.4	120.8	1.23	92.5
	(b)	102.0	73.6	135.8	1.32	98.1
アブラガレイ Arrow toothed flatfish	(a)	176.9	82.7	206.8	1.17	96.7
イシナギ Black sea bass	(a)	183.3	80.8	214.6	1.17	94.8
メヌケ Rockfish	(b)	202.5	72.8	244.0	1.21	87.7

前報迄の方法で得たA濃縮物
(a) Vitamin A concentrate prepared as in the previous report.

(a) を更にメタノール処理したもの
(b) (a) treated by methanol.

(a) をアルミナ吸着で精製したもの
(c) (a) purified by alumina adsorption.

は激減する。この吸着操作を行つた精製A濃縮物と行わないものをそれぞれアセチル化して分子蒸溜を行い，その主溜分を比較した場合，臭味，色調の差はさらに顕著である。酸性白土は産地により活性が異るから弱化する苛性ソーダの量は使用白土に応じて変更する必要があろう。

諸種のA濃縮物について苛性ソーダ弱化白土による吸着処理を行つた結果を Table 8 に示す。

（4） 苛性ソーダ弱化白土によりA濃縮物を吸着処理した時の成分の変化

苛性ソーダ弱化白土を用いて大ザメ肝油より製造したA濃縮物を吸着処理し，処理の前後のA濃縮物につきそれぞれアルミナクロマト区分[10]を行つた結果は Table 9, Fig. 1 のようになる。

この図，表に見るように吸着処理により供試A濃縮物中の第3区分すなわちAよりもアルミナに吸着され易い不純物（分解物，OH 基2ケを有するアルコール類など）はほとんど完全に吸着除去され，更に第2区分すなわちAと同程度にアルミナに吸着される区分中の不純物の大半が苛性ソーダ弱化白土により吸着除去されている。苛性ソーダ弱化白土により吸着除去される不純物の多少により濃縮効果も当然異る。これらの吸着される不純物については別に報告する予定である。

Table 9. 3.5% NaOH 弱化白土による吸着処理前後のA濃縮物のアルミナ・クロマト区分による比較
Vitamin A in alumina chromatographic fractions before and after the 3.5% NaOH-acid clay adsorption.

吸着処理の前後 Before or after treatment	試料重量 Sample wt. (g)	(%)	A 単位 Vitamin A potency ×10⁴	濃縮比 Ratio of conc.	A 収 量 Vitamin A yield	アルミナクロマト区分 No. of alumina chromatographic fraction	重 量 Wt. (%)	A 単位 Vitamin A potency ×10⁴	A 収 量 Vitamin A yield (%)
吸着前 Before	0.5395	100	123.1	—	—	I	20.2	8.8	1.5
						II	60.7	191.9	94.5
						III	19.1	—	—
吸着後 After	0.3489	64.9	181.5	1.47	95.5	I	19.7	10.5	1.8
						II	45.0	248.0	94.7
						III	0.2	—	—

試 料 大ザメ肝油濃縮物
Sample: Mixed shark liver oil concentrates.

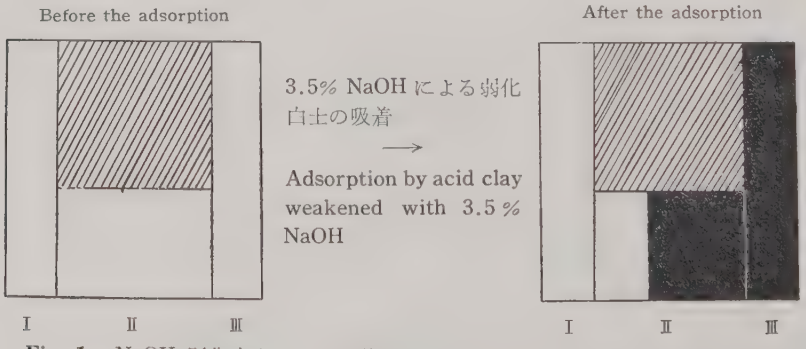


Fig. 1. NaOH 弱化白土による吸着処理前後をアルミナクロマト区分により比較
Alumina chromatographic fraction I, II and III before and after the NaOH acid clay adsorption.

斜線部分 Hatched part: Vitamin A
黒色部分 Black part : NaOH 弱化白土により吸着除去される不純物 Impurities which were removed by the NaOH acid clay adsorption.
試 料 Sample : 大ザメ肝油濃縮物 Mixed shark liver oil concentrates.

Table 10. KOH にて弱化せる鹿沼土によるクロマト法 Vitamin A in chromatographic fractions of *Kanuma* earth weakened with KOH.

区分 Fraction	非吸着物 Unadsorbed matter			
	重量 Wt. (%)	A 単位 Vitamin A potency × 10^4	濃縮比 Ratio of conc.	A 収量 Vitamin A yield (%)
I	45.2	152.5	1.27	57.3
II	11.8	155.6	1.29	15.3

吸着剤 Adsorbent: 10% KOH 弱化鹿沼土，加熱 150°C *Kanuma* earth weakened by 10% KOH heated at 150°C.
試料 Sample: マグロ肝油濃縮物 Tuna liver oil concentrates Vitamin A unit, 1,203,000 u.s.p.u.
溶剤 Solvent: 両区分共にベンゼン 30 cc Benzene 30 cc in both fractions.

（5） 苛性カリ弱化鹿沼土による吸着試験

マグロ肝油より製したA濃縮物を試料とし苛性カリ弱化鹿沼土によるクロマト法を行つた結果を Table 10 に示した。

摘　　要

ビタミンAを経済的に濃縮する方法の一工程として弱化酸性白土を用いる吸着精製法を吟味した。その結果ビタミン油よりえたA濃縮物について苛性ソーダにより適当に弱化した酸性白土を吸着剤とし，ベンゼンを溶剤として分散吸着法による吸着操作を行えば，A濃縮物中の不純物は効果的に除去され，この方法は工業的に採用しうる精製操作であると思われる。

文　　献

1) 東秀雄・新間彌一郎・衣巻豊輔・山川健重： 特許 236031 (1957).
2) 東秀雄・山川健重・衣巻豊輔： 本誌 **20**, 557 (1954).
3) P. Karrer and K. Schöpp: Helv. Chim. Acta. **14**, 1431 (1931).
4) E. Lederer, P.K. Tchen, H. Pénau and G. Hagemann: Bull. soc. Chim. biol. **26**, 1032 (1944).
5) 笠間悌一・浜野貞行・上野庚次郎： 特許 164680 (1944).
6) P.B. Müller: Helv. Chim. Acta. **26**, 1945 (1943).
7) J. Green, D.O. Singleton: Analyst. **79**, 431 (1954).
8) 稲垣誠： 1956 年本会春季大会にて講演.
9) 東秀雄・山川健重・金子徳五郎・杉井麒三郎： 本誌，**25**, 59 (1959).
10) 新間彌一郎・田中稔： 本誌，**25**, 52 (1959).

魚類肝臓のビタミン B_2 含量について

東　秀雄・村山繁雄・田部井菊子

日本水産学会誌
第二十五巻　第十～十二号　別冊
昭和三十四年十二月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 25, Nos. 10-12, Dec. 1959.

魚類肝臓のビタミン B_2 含量について

東　秀雄・村山繁雄・田部井菊子

(1959 年 10 月 29 日受理)

RIBOFLAVIN CONTENTS IN THE LIVER OF FISH

Hideo Higashi, Shigeo Murayama and Kikuko Tabei*

1. Individual variations in riboflavin contents in the liver of fish have been assessed with respects to about twenty different species of fish made available since 1941. It has been found that among the same species of fish large and apparently old individuals do not always contain a greater amount of riboflavin in their liver than smaller ones. This phenomenon is partly different from the previous findings by Higashi et al (1942).

Generally speaking, the variation between the minimum and maximum contents remained within the range of three times. An extreme case, however, was with "aodai", *Paracaesio caeruleus*. Among individuals of this species discrepancy of the riboflavin contents was about seven times. Higashi et al (1942) reported the discrepancy much greater than in the present works.

2. Riboflavin contents in the liver have been compared among different species of fish with respect to the weight ratio of the liver to the body. In some kinds of fish such as sharks, which showed the ratio higher than the other species, the riboflavin content was not found so high as the latter group of fish. The level of their riboflavin content was lower than 3 γ/g. (Fig. 1).

3. Another group of fish showed a tendency where the greater the weight ratio of the liver to thebody, the lower was the riboflavin contents in different individuals of the same species. They were common mackerel, skipjack, Alaska pollack and red salmon (Figs. 2～4).

I. 緒　　言

魚類肝臓のビタミン B_2 (以下単に B_2 と記す) 含量については多くの報告[1]があるが，含量の差異について吟味した研究は少ない。東・井関[2]の研究により，肝臓の B_2 濃度は魚種により，また同一魚種においても個体間に大きな差異があること，数種の魚類において老大魚の肝臓は幼小魚の肝臓にくらべ B_2 濃度が著るしく高いことが見出されている。また清水・日笠[3]は，数種魚類の肝臓について，魚体の成熟に伴なう B_2 含量の変異を検討している。

著者らはその後諸種の魚類肝臓の B_2 含量を測定し，魚種間の変異および同一魚種における個体間の変異について検討した。その結果魚種によつてはさきに著者らの報告した事例に反し，大型魚の肝臓の方が小型魚の肝臓よりも B_2 含量の小なる事例も観察された。また肝臓の体重に対する重量比が小なる魚種は，肝臓中の B_2 含量の低いこと，肝臓の重量比と肝臓中の B_2 含量との間に，ある魚種では負の相関がみられることを知りえたので，これらについて報告する。なお前報告の前後において測定した未発表の測定値をも，あわせてここに報告し検討を加えた。

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab. Chūō-ku, Tokyo, Japan).
東海区水産研究所業績 B 第 324 号.

II. 実験材料および方法

1. 供試料　試料は水揚げ直後にドライアイス中に保存したもの，あるいは水揚げ後氷詰めにして研究室へ運搬されたものである。ただし北洋産ベニザケは冷凍品で，またヤツメウナギは漁獲後活魚のまま研究室へ運搬されたものである。

2. 実験方法　試料の測定は，肝臓をよく磨砕し，その 0.5～0.2 g を採取し，これに蒸溜水 25～50 cc を加え 80°C の水浴中で 15 分間加温浸出を行ない，その浸出液の一定量をとり，ルミフラビン螢光法[4]によつて総 B_2 含量を測定した。

III. 実験結果および考察

1. 魚体の大小による肝臓中の B_2 含量の差異

著者らはすでに数種の魚類において，老大魚は幼少魚より肝臓中の B_2 含量が高いことを見出したが，さらにその後諸種の魚類について魚体の大小による肝臓中の B_2 含量の差異を検討した。

実験材料は同一漁場で同時期に漁獲された同種魚類の大小2尾をえらび，肝臓中の B_2 含量を測定した。その結果を Table 1 および Table 2 に示す。Table 1 には大型魚の肝臓の方が小型魚の肝臓より B_2 含量が多いか，または等しい例を示したが，この中のアオダイにおいては著者らがすでに報告したごとく，魚体の大きいものは小さいものにくらべ肝臓中の B_2 含量が著るしく高く，その差異は6倍以上に達した。その他の魚類においては肝臓中の B_2 含量の差異はそれ程大でない。Table 2 には大型魚の肝臓の方が小型魚の肝臓より B_2 含量が少ない例を示した。既報の事例においては，いずれも大型魚の肝臓の方が小型魚の肝

Table 1. Vitamin B_2 content in the liver of various fishes correlated with individual size.*

Species	Body length cm	Body weight g.	Liver weight g.	$\frac{\text{Liver weight}}{\text{Body weight}} \times 100$	B_2 content in liver γ/g.	Source of the samples
アオダイ (Aodai) *Paracaesio caeruleus*	38.5 25.5	1310 430	7.5 4.3	0.57 1.0	206 31.9	Tsukiji, Tokyo, Oct., 57
アコウ Red rock cod *Sebastodes matsubarae*	30.2 22.5	645 310	7.5 9.0	1.16 2.9	7.9 5.3	Inatori, Shizuoka Pref., Mar., 58
ウマヅラ File fish *Cantherines unicornu*	23.5 20.5	310 230	34 22	11.0 9.55	2.9 2.2	Ito, Shizuoka Pref., Mar., 58
マトオダイ John dory *Zeus japonicus*	33 26	960 465	53 33.7	5.5 7.25	2.8 2.8	Manazuru, Kanagawa Pref., Dec., 54
カツオ Skipjack *Katsuwonus pelamis*	66.0 54.5	7560 4390	62.0 33.5	0.82 0.76	14.0 13.4	N 33°51′, E 136°44′, Feb., 42
メイチダイ *Gymnocranius griseus*	67.0 63.0	7350 6500	63.5 74.0	0.86 1.14	3.8 2.1	Ashizurimisaki, Kōchi Pref., Apr., 41
アコウ Rock fish *Sebastes matsubarai*	48.0 37.5	3000 1650	14.0 12.0	0.47 0.73	7.7 6.3	N 33°45′, E 136°10′, Feb., 42
ヤリヒゲ(トウジン) Rat-tail *Coelorhynchus multispinulosus*	68.0 58.0	1625 1600	48.0 110.0	2.97 6.89	10.2 5.4	N 33°34′ E 136°0′, Feb., 42
ヒラメ Flatfish *Paralichthys olivaceus*	54.5 49.5	4750 2890	81.0 52.0	1.71 1.80	7.4 5.3	Off Chiba Pref., Aug., 42

* The values of samples obtained before 1954 are baised on unpublished data by Higashi and Izeki.

Table 2. Vitamin B_2 content in the liver of various fishes adversely correlated with individual size.

Species	Body length cm	Body weight g.	Liver weight g.	$\frac{\text{Liver weight}}{\text{Body weight}} \times 100$	B_2 content in liver γ/g.	Source of the samples
アブラザメ Dogfish *Squalus sucklii*	97 83	7800 4760	1120 618	14.4 13.0	2.8 3.1	Onahama, Ibaragi Pref., Apr., 55
マス Pink salmon *Salmo milktschitsch*	38.5 30.3	840 435	16.5 13.8	1.96 3.17	9.5 12.2	Sado Island, Niigata Pref., Apr., 58
ウグイ A kind of minnow *Leuciscus hakonensis*	32 23	500 180	13.1 2.4	2.62 1.33	7.5 13.0	Urayasu, Chiba Pref., Sep., 55
クロシビカマス(Sumiyaki) *Promethichthys prometheus*	46.2 22.3	673 64.8	11.8 1.1	1.75 1.70	7.9 11.0	Manazuru, Kanagawa Pref., July, 55
ブリ Yellow tail *Seriola quinqueradiata*	64 34	5850 890	78 17	1.33 1.91	8.8 10.0	Manazuru, Kanagawa Pref., Oct., 55
キントキ *Priacanthus hamrur*	26.5 15.5	400 95	12.8 1.0	3.2 1.05	2.8 6.9	Manazuru, Kanagawa Pref., Jan., 55
アラ Deep sea bass *Niphon spinosus*	50.5 42	2500 1300	37 17	1.47 1.31	5.9 7.3	Inatori, Shizuoka Pref., Mar., 58
ヤハタ Common grouper *Epinephelus septemfasciatus*	29.8 22.2	859 275	9.5 3.5	1.1 1.27	10.6 14.4	Ōshima Island, Tokyo, Apr., 58
イサキ (Isaki) *Parapristipoma trilineatum*	29.7 14.3	537 53	4.9 0.6	0.92 1.13	10.0 13.0	Manazuru, Kanagawa Pref., July, 55
ヘダイ Porgy *Sparus aries*	20 14.5	330 125	4.7 2.0	1.42 1.60	5.8 13.0	Manazuru, Kanagawa Pref., Oct., 54
ブダイ Parrot fish *Leptoscarus japonicus*	25.2 20.7	510 240	16 4	3.14 1.67	5.4 9.8	Shimoda, Shizuoka Pref., Mar., 58

臓よりも含量が大であつたが，その後の調査によつて Table 2 に示すごとく逆に小型魚肝臓の B_2 含量の方が大である事例も観察された。大型魚の肝臓が小型魚の肝臓より B_2 含量の多い事例と少ない事例とがあることは，魚種による特性か，生活環境によるものか，その原因については不明である。肝臓中に B_2 が著るしく多量に蓄積される事例は一般魚類においてはほとんど観察されていないが，アオダイにおいては既報および本報の結果からも著量の B_2 を肝臓に蓄積することが観察された。(既報のアオダイにおいて肝臓中の B_2 含量は大型魚 83.7γ/g，小型魚 1.3γ/g を示し，その差は数十倍に達している。)

2. 魚類肝臓の重量比と B_2 含量との関係

Table 1 および Table 2 に示した以外の試料につき肝臓中の B_2 含量を測定した結果を Table 3 に示す。Tables 1, 2, 3 に示した全魚類について肝臓の重量比（肝臓重量の体重に対する百分比）と肝臓中の B_2 含量との関係を図示すれば Fig. 1 のごとくなる。Fig. 1 にみられるごとく肝臓重量比の小さい魚種においては，肝臓中の B_2 含量が魚種により多様であるが，肝臓重量比の大きい魚種においては，いずれも肝臓中の B_2 含量が小で 3γ/g 以下のものが多い。これらの魚種はサメ類およびウマヅラ・マトウダイである。一般にサメ類肝臓は他の魚類肝臓にくらべ B_2 含量が低いが，サメ類肝臓は含油量が著大であるため，肝臓中の B_2 含量を肝臓脱脂物当りの B_2 含量に換算して，その他の魚類と比較すれば，特に B_2 含量が低

いということはない。

3. 同種魚類における肝臓重量比と B_2 含量との関係

同種魚類においては肝臓の重量比と B_2 含量との間に一定の関係を示すものがある。その事例をつぎに示す。

例1　サバの場合　　サバ 20 尾を試料とし，肝臓中の B_2 含量を測定した。肝臓の重量比と肝臓中の B_2 含量との関係を図示すれば Fig. 2 のごとくなり，肝臓の重量比が大きい魚体程 B_2 含量の低い傾向が認められる。この相関係数を求めると $r = -0.59$，自由度 18 で，1% の危険率において負の相関が認められる。

例2　カツオの場合　　カツオ5尾について肝臓中の B_2 含量を測定した。その結果を図示すれば Fig. 3 のごとくなり，測定尾数は少ないがサバにおける傾向と一致している。

例3　スケソウの場合　　スケソウ9尾について肝臓中の B_2 含量を測定した結果，Fig. 4 のごとくなり例 1，2 におけると同様な傾向が認められた。

Table 3. Vitamin B_2 content in the liver of other fishes than those in Tables 1 and 2.*

Species	Body length cm	Body weight g.	Liver weight g.	Liver weight / Body weight ×100	B_2 content in liver γ/g.	Source of the samples
ヤツメウナギ Lamprey *Entosphenus japonicus*	43.0～51.3	160～263	2.5～5.4	1.56～2.93 (2.13)	5.7～11.3 (7.99)	Mogami River, Yamagata Pref., May, 56 and May, 58, (10 individuals)
カエルザメ *Heteroscymmus longus*	84.5 85.0	5500 5300	914 830	16.6 15.7	2.6 2.5	Yaizu, Shizuoka Pref., Jan., 55 〃
トラザメ A kind of chain dogfish *Catulus torazame*	96 92	6850 5950	1125 780	16.4 12.9	0.1 1.5	N 33°34′, E 136°0′, Feb., 42 〃
ジンベエザメ *Rhinodon typus*	330	300000	18900	6.33	6.4	Sagami Bay, Aug., 43
シュモクザメ Hammerhead shark *Sphyrna zygaena*	94	11230	1005	8.99	1.5	N 33°40′, E 134°52′, Feb., 43
ヨシキリザメ Great blue shark *Prionace glauca*	196	50670	3350	6.61	4.4	N 32°51′, E 136°44′, Feb., 42
〃	270	273750	35600	13.0	1.5	unknown
ヒラガシラ *Scoliodon walbeehmi*	188	98625	14350	14.8	2.9	Formosa, Oct., 41
ウルメイワシ Round herring *Etrumeus micropus*	21.0	150	1.3	0.87	6.9	Manazuru, Kanagawa Pref., Jan., 55
ベニザケ Red salmon *Oncorhynchus nerka*	37.3～61.0	760～3705	12.0～117.5	1.16～3.82	4.8～17.7 (11.7)	Bering Sea, June～Aug., 58, (50 individuals)
ニジマス Rainbow trout *Salmo irideus*	26.4～32.6	250～510	2.2～5.5	0.74～1.08 (0.89)	6.7～17.0 (10.0)	Fuji, Shizuoka Pref., July, 55, (6 individuals)
ウナギ Eel *Anguilla japonica*	20.3～65.0	12.5～650	0.43～11.5	1.44～3.4 (2.07)	10.9～17.2 (12.9)	Hamana Lake, Shizuoka Pref., May, 56, (8 individuals)
サンマ Saury *Cololabis saira*	30.0	130	2.3	1.77	16.0	Tsukiji, Tokyo, Sept., 54
カマス Barracuda *Sphyraena japonica*	27.0	225	2.7	1.20	7.4	Manazuru, Kanagawa Pref., Oct., 55
ボラ Mullet *Mugil cephalus*	17.5～27.5	150～440	2.3～10.3	1.53～2.4 (1.82)	12.0～13.0 (12.8)	Urayasu, Chiba Pref., Sep., 55

Species	Body length cm	Body weight g.	Liver weight g.	$\frac{\text{Liver weight}}{\text{Body weight}} \times 100$	B_2 content in liver γ/g.	Source of the samples
キンメダイ Alfonsim de costa *Beryx splendens*	33.9	1258	33.5	2.6	7.0	N 35°9′, E 139°18′, Mar., 41
サバ Common mackerel *Scomber japonicus*	25.0～33.4	220～570	1.9～8.8	0.58～1.76 (1.15)	6.4～17.6 (10.85)	Zenisu, Kanagawa Pref., Chōshi and Katsuura, Chiba Pref., Apr.～May, 58, (20 individuals)
ソオダガツオ Frigate mackerel *Auxis thazard*	26.0～41.0	315～1470	4.5～29.5	1.43～2.0 (1.63)	6.3～16.0 (12.1)	Manazuru, Kanagawa Pref., Sep., 55, (4 individuals)
メバチ Bigeye tuna *Parathynnus sibi*	118	40600	243	0.60	4.7	unknown. Jan., 40
〃	62	6130	82.0	1.34	4.7	N 29°31′, E 129°28′, Jan., 41
マグロ Bluefin tuna *Thynnus thynnus*	27.0	555	7.1	1.28	16.0	Manazuru, Kanagawa Pref., July, 55
クロカワ Black marlin *Makaira mazara*	158	72000	1140	1.58	10.6	N 29°36′, E 136°32′, Feb., 42
ブリ Yellow tail *Seriola quinqueradiata*	75	9700	14.5	1.48	4.1	Off Chōshi, Chiba Pref., Feb., 42
ムロアジ Mackerel scad *Decapterus muroadsi*	24.5	175	2.2	1.23	13.0	Manazuru, Kanagawa Pref., July, 55
シマアジ *Caranx mertensi*	14.0	70	0.7	1.0	12.0	Manazuru, Kanagawa Pref., July, 58
シイラ Dolphin *Coryphaena hippurus*	62	3600	45.5	1.27	18.1	N 33°51′, E 133°44′, Feb., 42
ムツ *Scombrops boöps*	17.5	100	1.2	1.2	10.0	Manazuru, Kanagawa Pref., July, 55
〃	49.5	4160	194	4.67	6.4	unknown, Mar., 41
ハクテンハタ A kind of rock-cod *Epinephelus* sp.	107	31600	730	2.31	4.8	Inubōzaki, Chiba Pref., Mar., 42
ヒメコダイ *Chelidoperca hirundinacea*	100	57375	178	0.31	4.9	unknown. Jan., 40
メジナ (Mejina) *Girella punctata*	23.0	350	3.3	0.95	6.9	Manazuru, Kanagawa Pref., Jan., 55
トゲニベ A kind of croaker *Sciaena* sp.	106	9600	15.0	1.56	4.8	Formosa, Oct., 41
タカノハダイ *Goniistius zonatus*	27.0	400	5.4	1.35	10.0	Manazuru, Kanagawa Pref., July, 55
アマダイ *Branchiostegus japonicus*	41.0	1460	8.1	0.56	10.4	Ōiso, Kanagawa Pref., Nov., 55
ニザダイ Surgeon fish *Xesurus scalprum*	20.5	295	4.5	1.63	16.0	Manazuru, Kanagawa Pref., July, 55
カサゴ Rock cod *Sebastiscus marmoratus*	16.5～42.5	120～310	0.6～3.1	0.5～1.0 (0.69)	4.1～6.9	Manazuru, Kanagawa Pref., Jan. and July, 55, (4 individuals)
ヒラメ Flatfish *Paralichthys olivaceus*	29.0	360	2.7	0.75	15.0	Manazuru, Kanagawa Pref., Sept., 55
スケソウ Alaska pollack *Theragra chalcogramma*	26.5～48.0	205～950	5.8～52.0	2.07～5.90 (3.97)	4.7～9.4 (7.42)	Yamagata Pref., Dec., 55, (9 individuals)

* The values of samples obtained before 1954 are based on unpublished data by Higashi and Izeki.

Numerals in parentheses indicate the mean values.

Fig. 1. 肝臓の B_2 含量と肝臓重量比

Relation between vitamin B_2 content in liver and weight ratio of liver to body of fish listed in Tables 1～3.

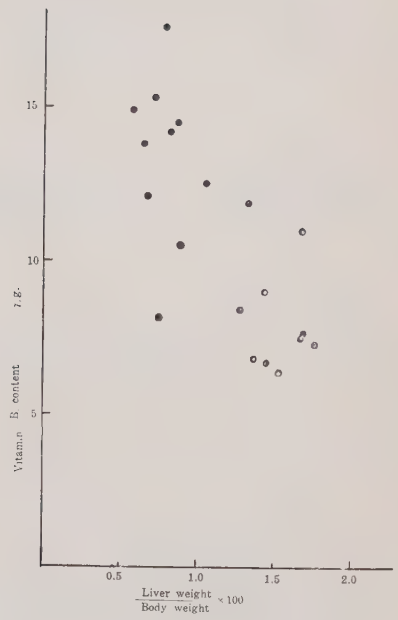


Fig. 2. サバにおける肝臓の B_2 含量と肝臓重量比

Relation between vitamin B_2 content in liver and weight ratio of liver to body of common mackerel.

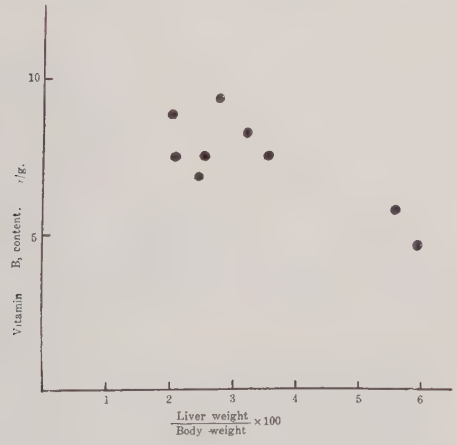


Fig. 4. スケソウにおける肝臓の B_2 含量と肝臓重量比

Relation between vitamin B_2 content in liver and weight ratio of liver to body of Alaska pollack.

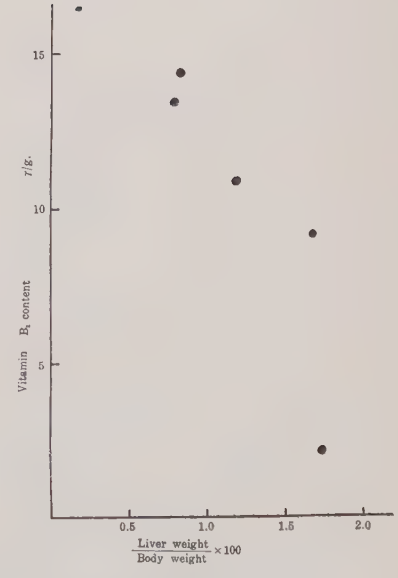


Fig. 3. カツオにおける肝臓の B_2 含量と肝臓重量比

Relation between vitamin B_2 content in liver and weight ratio of liver to body of skipjack.

その他北洋産ベニザケ 50 尾の肝臓について B_2 含量を測定した結果，別報[5]のごとく，肝臓重量比が大きい魚体程 B_2 含量の低い傾向が認められた（相関係数，$r = -0.58$，自由度 48）。

IV. 摘　　要

諸種魚類肝臓のビタミン B_2 含量を測定し，つぎの結果をえた。

1. 同種魚類において肝臓中の B_2 含量は，大型魚の方が小型魚より多い事例と少ない事例とが認められた。

2. 肝臓重量比が大きい魚種（サメ類，ウマヅラ，マトウダイ）は，肝臓中の含量が小で，その値は 3 γ/g 以下のものが多い。

3. サバ，カツオ，スケソウ，ベニザケにおいて肝臓重量の体重に対する重量比が大きい魚体程，肝臓中の B_2 含量の低い傾向が認められた。

文　　献

1) Billings, F.L., Biely, J., Fisher, H. and Hedreen, C.: J. Nutr., 22, **4**, 25 (1941).
Sautier, P.M.: Commercial Fisheries Review, **17**, No. 2, 8～11 (1946).
日比　弘・堀田一雄：ビタミン，**13**, No. 2, 172 (1957).
2) 東　秀雄・井関重夫：日農化誌，**18**, 369 (1942).
3) 清水泰幸・日笠七郎：南海区水産研究所報告，**8**, 78 (1958).
4) 藤田秋治：ビタミン，**2**, 34 (1950).
5) 村山繁雄・簗瀬正明・田部井菊子：東海区水産研究所報告，No. 25, 67～79 (1959).

酒肴とされている水産製品(主として塩醤品)の栄養成分含量

Nutritive Elements in Salted Marine Appetizers

(昭和34年1月31日受理)

東　秀雄 (Hideo Higashi)　菊地　嶺 (Ryo Kikuchi)　田部井菊子 (Kikuko Tabei)

Very few data is known about the nutritive elements of salted marine appetizers, though they are popularly tasted by Japanese, especially in the cases of riquors since hundreds years before.

The authors determined the content of proteins, fats, vitamins and minerals on representative manufactures which are sold in department stores. The results are illustrated in Table 1, 2 and 3.

緒　言

うに，塩辛のごとく酒肴として愛好される水産塩醤品は種類が多く，生産量も多いが，その栄養成分，ことにビタミン，ミネラルなどについて報告された例は少ない。著者らは水産塩醤品について，これらの栄養成分を測定したのでその結果を報告する。

試料および定量方法

I　試　料

東京都内で販売されている製品を試料とした。それら試料の商品名，包装形態，内容量などは第1表に記載した。

II　定量方法

諸成分の定量方法は次のごとくである。

(1) 水分　試料を105°C～110°Cで乾燥し，乾物の恒量を求めて水分を測定した。

(2) 粗蛋白質　キルダール法により全窒素を定量しそれに6.25を乗じて粗蛋白量とした。

(3) 粗脂肪　試料に無水硫酸ソーダを加えて磨砕，脱水した後，精製エーテル*1)で抽出し，得たエーテル可溶物を粗脂肪とした。

(4) 粗灰分　試料を600°C以下で灰化し，残存物を粗灰分とした。

(5) 食塩　上記粗灰分定量によつて得た灰化試料を磨砕し，水で浸出，濾過して濾液の一部をとり，クロム酸カリ溶液を加えて硝酸銀溶液で滴定し，食塩を算定した。

(6) Ca　試料を硝酸，硫酸および過塩素酸を用いる湿式分解法により分解して検液を調製した。

検液の一定量をとり，蓚酸アンモン溶液を加えて加温放冷後生成せる蓚酸カルシウム沈澱を濾別，洗滌した後加温稀硫酸で沈澱を溶解して過マンガン酸カリにより蓚酸を滴定し，Ca量を算出した。**

(7) P　前記検液の一定量をとり，呈色試薬としてモリブデン酸アンモン溶液，ハイドロキノン溶液および亜硫酸ソーダ溶液を用いて発色させ650mμの吸光値を測定し，あらかじめ KH_2PO_4 標準液によつて得られた数値から試料中のP量を求めた。**

(8) Fe　前記検液の一定量をとり，酢酸ソーダ溶液によりpHを調整した後，呈色試薬としてハイドロキノン溶液およびフェナントロリン溶液を加えて発色させ510mμの吸光値を測定し，あらかじめ硫酸第一鉄アンモン標準液によつて得られた数値から試料中のFe量を求めた。**

(9) ビタミンAおよびカロチン　粗脂肪定量により得たエーテル可溶物を鹸化し，石鹸液より精製エーテルで不鹸化物を抽出した。その不鹸化物を石油エーテルに溶解し，アルミナを用いてクロマトをおこない，カロチン画分とA画分とを分離し，カロチン画分は石油エーテルを除いてクロロホルムに溶解し，その吸光曲線を求め極大の位置，形状がβカロチンのそれとほぼ一致するものについてカロチン含量を算出した。A画分は石油エー

* エーテル可溶物からAおよびカロチンを測定したので，抽出に用いたエーテルは精製して過酸化物を除いた。

** ここに記載したCa, P, Feの定量方法は食糧研究所の定量法として採用されている。

東海区水産研究所業績B才307号

テルを際いてクロロホルム溶液とし，三塩化アンチモンのクロロホルム溶液を用いる比色定量法[2]によつてA含量を測定した。

(10) ビタミンB_2　磨砕した試料に約10倍の水を加え80°C，15分間時々振りまぜながら浸出する。この浸出液に同量の1%酢酸および2倍量のクロロホルムを加えて振盪，遠心分離してクロロホルム可溶物を抽出除去した後，ルミフラビン螢光法[3]により総B_2を定量した。

(11) ビタミンB_{12}　磨砕した試料1gにトリプシン50 mgを添加し，約50ccの水と約0.5ccのトルオールとを加えて時々攪拌しつつ37°C，48時間消化した後15分間100°Cに加熱し，全容を50ccとして濾過する。この濾液を Euglena 法[4]により定量した。基本培地は酸分解カゼインを添加した Hutner の中性培地[5]を使用した。

(12) パントテン酸　磨砕した試料を Ives M. & Strong F. M. の方法[6]により酵素分解した。即ち試料2gに水約50ccを加え，懸濁液の pH を6.8～7.0とし，15*lb* 15分間加熱する。冷却した後ミラーゼP約0.1gを加え，2.5M酢酸ソーダ2ccを添加し，塩酸で pH を4.8とする。トルオールを加え，15時間消化後全容を50ccとして濾過した。この濾液について Lactobacillus arabinosus 17-5 を用いる Skeggs-Wright の方法[7]によりパントテン酸を定量した。培養は2ccでおこない比濁により測定した。

(13) 葉酸　磨砕した試料を Bird らの方法[8]にしたがい酵素分解した。即ち試料2gに水約20cc，0.1M酢酸緩衝液(pH 4.5) 5ccを加え，これに新鮮腎臓の約0.4g相当の酵素液を加え，トルオールを数滴加えて45°Cに16時間おいた後，1N苛性ソーダで pH7.0とし水を加えて50ccとして，15*lb*，5分間加熱する。これを Streptococcus faecalis R を用いる Teply-Elvehjem 法[9]により定量した。培養は2ccでおこない，比濁により測定した。

結果および考察

上記定量方法によつて各試料の栄養成分を測定した結果を第1表および第3表に示す。

第1表に見るごとく，がん漬の Ca 含量は著しく高いが，これは蟹を殻ごと処理した製品であるためであろう。食品を Ca 補給源として考える場合 Ca 含量の多寡が重要なことは勿論であるが，Ca：P の比も軽視できない。Ca補給源としては Ca：P の比が大きいことが望ましい。第1表の結果から Ca 含量の多いものについて Ca：P の比を求めたものが第2表である。第2表に見るごとくがん漬のほかにあみの塩辛，鮑としろ，鰹酒盗，鰹の塩辛などが Ca 食品としてすぐれている。

第1表　一般成分および無機質

No.	試料	水分	粗蛋白質	粗脂肪	粗灰分	食塩	Ca	P	Fe	備考
		%	%	%	%	%	mg%	mg%	mg%	
1	鰹の塩辛	62.5	12.8	2.20	21.9	20.5	178	171	3.0	
2	〃 酒盗	71.2	11.9	1.82	12.9	8.4	190	111	6.7	素焼壺，ポリエチレン袋 110 g
3	鮎 うるか	57.3	11.4	8.52	22.0	19.8	173	216	13.0	高知産，素焼壺，ポリエチレン袋 68 g
4	めふん	70.0	12.5	1.76	15.4	14.5	64	225	10.0	壜詰 340 g
5	いかの塩辛(普通)	67.3	14.6	0.99	16.0	11.7	82	279	2.5	
6	〃 (墨作り)	60.5	20.6	3.47	13.5	10.3	85	255	3.2	
7	〃 (麹漬)	62.4	14.9	0.14	11.4	10.5	88	192	2.5	
8	このわた	77.5	9.8	1.27	12.4	10.3	85	168	3.6	壜詰 82 g
9	あみの塩辛	55.5	12.2	0.53	32.1	29.2	512	267	2.8	
10	ほやの塩辛	68.7	10.0	2.66	12.7	11.2	57	120	3.2	塩釜産，壜詰，185 g (ほやを酒の中で洗い塩漬けしたもの)
11	鮑としろ	66.1	12.1	4.82	15.9	13.2	254	144	28.0	塩釜産，素焼壺，ポリエチレン袋 135 g (鮑のふの塩辛)
12	がん漬	50.0	12.2	0.55	36.4	29.2	4200	258	1.7	
13	かに子漬	38.3	31.4	6.39	9.4	7.0	48	493	4.2	壜詰 340 g
14	えび糀漬	58.4	16.0	0.34	9.9	8.0	143	192	4.0	
15	長崎うに	65.5	14.8	8.52	6.7	5.4	20	300	3.0	長崎産，壜詰，ポリエチレン中蓋， 70 g
16	うにみそ	34.6	7.2	2.91	7.8	6.7	88	285	2.0	壱岐産，壜詰コルク中蓋， 90 g
17	からすみうに	53.9	25.1	9.95	9.2	7.3	50	462	3.6	壜詰，ポリエチレン中蓋， 98 g
18	からすみ	23.1	39.9	26.10	6.4	4.2	56	375	6.0	98 g
19	鯛の子塩辛	56.0	19.1	1.77	22.2	20.5	113	327	5.7	新潟産
20	たらこ	64.0	29.1	0.60	8.3	6.4	50	477	1.5	
21	すじこ	51.0	20.1	7.30	7.3	4.8	100	592	4.4	
22	かずのこ	60.8	20.2	0.14	18.5	18.1	49	135	7.2	
23	入きん子	66.0	16.4	0.49	16.5	15.4	41	252	4.4	富山産，壜詰100 g (生たらこをアルコール加味精製したもの)
24	ふぐの燻しすじ	40.9	41.0	1.17	16.2	15.1	71	274	2.5	金沢産，わらづと112 g (ふぐの肉片を塩干し，糀，米糠，塩で漬込み2～3年貯蔵醗酵させたもの)
25	平貝の粕漬	60.0	20.4	0.44	5.6	3.5	67	168	3.2	

第2表　Ca 含量と P 含量の比率

o.	試料	Ca	P	Ca/P	No.	試料	Ca	P	Ca/P
		mg%	mg%				mg%	mg%	
2	がん漬	4200	258	16.25	3	鮎うるか	173	216	0.80
9	あみの塩辛	512	267	1.92	14	えび糀漬	143	192	0.75
1	鮑としろ	254	144	1.76	19	鯛の子塩辛	113	327	0.35
2	鰹酒盗	190	111	1.71	21	すじこ	100	592	0.17
1	鰹の塩辛	178	171	1.04	7	いかの塩辛	88	192	0.46

第3表　ビタミン類の含量

No.	試料	A	カロチン	B_2	B_{12}	パントテン酸	葉酸
		IU/100g	γ/100g	γ/g	γ/100g	γ/g	γ/100g
1	鰹の塩辛	130	—	2.66	0.56	3.5	37.5
2	〃 酒盗	650	—	1.66	0.84	2.3	30.0
3	鮎うるか	190	20	2.62	11.0	7.8	72.5
4	ふめん	0	—	28.4	22.5	10.23	52.5
5	いかの塩辛（普通）	100	—	2.86	0.98	3.18	7.0
6	〃 （墨作り）	410	—	1.76	2.1	6.5	29.5
7	〃 （麹漬）	0	—	0.66	0.4	2.2	13.0
8	このわた	90	60	5.29	12.5	11.3	43.8
9	あみの塩辛	20	—	0.97	4.22	8.0	14.75
10	ほやの塩辛	20	90	2.52	0.78	1.2	10.5
11	鮑としろ	70	1800	7.33	12.5	5.03	30.0
12	がん漬	10	40	4.98	0.66	2.72	25.0
13	かに子漬	50	1400	19.6	0.62	39.4	75.0
14	えび糀漬	10	—	0.06	0.60	8.5	17.8
15	長崎うにそ	300	2500	3.68	1.60	1.8	147.0
16	うにそみ	0	1320	1.17	0.16	3.1	35.0
17	からすみうにそみ	110	—	7.08	3.6	19.0	157.0
18	からすみ	210	—	6.56	0.785	20.6	2.5
19	鯛の子塩辛	0	—	2.42	2.58	11.25	37.6
20	たらこ	20	—	3.50	4.42	35.0	27.5
21	すじこ	210	—	4.31	1.68	14.0	45.0
22	かずのこ	30	—	0.86	0.693	1.6	1.0
23	入きんし子	30	—	2.50	3.5	16.0	22.0
24	ふぐの燻しすじ	0	—	0.92	0.16	13.8	31.0
25	平貝の粕漬	0	—	1.27	1.5	1.88	75.0

Fe 含量は鮑としろ，めふん，鮎うるかなどが高い。第3表に見るごとく，A含量は供試料中で鰹酒盗，いの塩辛(墨作り)，長崎うに，からすみ，すじこなどがいもので，めふん，いかの塩辛(麹漬汁)などにはほとどAが検出されなかつた。

魚類の幽門垂，腎臓(めふん原料)などには通常著量のが含まれている。例えば新鮮な鰹の幽門垂は約30000/100g，鮭類の腎臓は約10000IU/100g，いかの肝臓は15000IU/100g程度である。供試塩醤品は以上の内臓ほかに消化管，肉なども原料としているから，原料の含量は以上の内臓自体のA含量よりも若干少ない計算なるが，すくなくとも数分の一程度のAを含んでいるずである。しかるに供試料中でA含量の高い鰹酒盗，かの塩辛などでも新鮮原料のA含量にくらべると数十の一に過ぎず，めふんにおいてはAがほとんど認められなかつたのは，いずれも製造後にAが減少してしまうめであろう。

カロチン含量は長崎うに，鮑としろなどが相当高いが鮎うるか，このわた，ほやの塩辛，がん漬などは低く，そのほかはごく微量であつた。

魚介類の内臓には相当多量の B_2 が含まれていることは以前から知られている。[10][11] 第3表に見るごとく，内臓を原料とする製品の B_2 含量は高く，これら製品の原料の B_2 含量と大体近似した値を示している。一般に魚介類の肉質部の B_2 含量は 0.5～2.0 γ/g[12] で上記塩醤品の B_2 含量は肉質部の B_2 含量よりかなり高い。ことにかに子漬，めふんなどの B_2 含量は一般食品に比し格段に高かつた。

魚類の腸内容物には B_{12} 含量の高いものがある。[13] 著者らが冷凍鮭の腎臓について B_{12} 含量を測定した結果によると 9～60 γ/100g で，鮭腎臓の製品であるめふんの B_{12} 含量もこの測定値の範囲内にある。そのほか鮎うるか，このわた，鮑としろなど，消化器を原料とする製品も B_{12} 含量が高く，これら製品の製造中あるいは貯蔵中に B_{12} の減耗はほとんどないことを示している。

魚類卵巣のパントテン酸含量は高く，肝臓と同程度あ

るいはそれ以上であるが***，卵巣製品であるたらこ，からすみ，かに子漬などのパントテン酸含量も高い。パントテン酸も B_2，B_{12} の場合と同様これら製品の製造中あるいは貯蔵中に減少しないことを示している。

葉酸含量は長崎うに，からすみうにでは比較的高い値を示したが，そのほかは一般魚肉と魚肝臓の葉酸含量***の中間の値である。

以上のごとく酒肴とされている水産製品のB群（B_2，B_{12}，パントテン酸，葉酸）の含量は概して魚介類の肉質部のそれにくらべて著しく高い。

B_2，B_{12} などはアルコールの代謝，解毒作用に関与するが，これらのビタミン類を濃厚に含む水産塩醤品が酒肴として愛好されているのは単に食味が酒に合うという以外に，酒害中和の体験から酒肴として選ばれてきたのであろう。

摘　要

酒肴とされている水産製品（主として塩醤品）について一般成分，無機質，ビタミン類の含量を測定した。

これらの食品は一般食品にくらべてB群含量が多く，中でも B_2，B_{12} の含量が高いから，栄養的にも酒肴として適当であることを指摘した。

*** 著者ら未発表研究

文　献

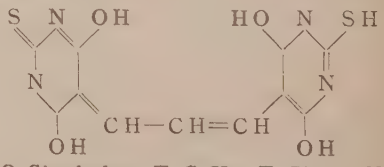
1) 藤田秋治，青山政太郎：ビタミン **2**, 190 (1950)
2) 平尾秀一等：日本水産学会誌 **18**, 73 (1952)
3) 八木国夫：ビタミン **9**, 349 (1955)
4) S. H. Hutner, et al: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **70**, 180 (1949)
5) 佐藤　裕：ビタミン **6**, 200 (1953)
6) Ives, M. & Strong, F. M.: Arch. Bioch. **9**, 251 (1946)
7) Skeggs, H. R., Wright, L. D.: J. Biol. Chem. **156**, 21 (1944)
8) Bird, O. D., Pressler, B., et al: J. Biol. Chem. **159**, 631 (1945)
9) Teply,L. J., Elvehjem, C. A.: J. Biol. Chem. **157**, 303 (1945)
10) 東　秀雄，井関重夫：日農化誌 **22**, 14 (1948)
11) 鷲見瑞穂，赤穂たみ：理研報 **19**, 240 (1940)
12) 日本食品標準成分表 (1954)
13) 簗瀬正明：日水誌 **21**, 197 (1955)

（東海区水産研究所）

酸敗の測定に用いられるTBA色素について

TBAと酸敗した脂肪との反応で作られる赤色色素は，食品中の脂肪の酸敗度を測定するのに応用されている。従来これらの色素は，TBAとカルボニル化合物との反応により生成すると考えられており，色々な研究が行われてきた。著者らは，鮭油，1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)，sulfadiazine 等と TBA との反応生成物を精製し，これらの反応生成物が全く同一物質であることを明らかにし，TEP の加水分解により得られる malonalde Lyde の場合について，その反応機構の推定を行った。

酸敗した鮭油1000g（TBA 数 257）と塩酸（1:1）の 20 ml を湯浴上で加熱還流し，窒素ガスを流し，冷却器より揮発性物質を流出せしめる。流出物を1%0.6N塩酸酸性 TBA 溶液に通ずる。30 分後 TBA 溶液を 40 分加熱還流せしめ，結晶を得た。次に酸敗した鮭油中に遊離の malonaldehyde が存在するか否かを確かめるために，10 g の鮭油を室温で窒素ガスを流し，流出してくる揮発性物質を上記の TBA 溶液中に通じた。2時間半後 malonaldehyde の定量を TBA 溶液で行い，全量の 2.2% の malonaldehyde が遊離して存在することが認められた。鮭油，TEP，sulfadiazine の TBA 誘導体の紫外部，可視部吸収スペクトルは全く同じであった。次にこれらの TBA の誘導体の分子組成について調べた結果TBA 2 分子，malonaldehyde 1 分子から成ることが確かめられたので，これに基づき，元素分析を行った。その結果，鮭油，sulfadiazine，malonaldehyde 等の TBA誘導体は $C_{11}H_8N_4O_4S_2$ の分子式を有し，TBA の 2 分子と malonaldehyde 1 分子から水 2 分子がとれた構造を有することが認められた。又，上記二者のペーパークロマトグラムも同一であった。これらより，TBA の赤色色素の構造は次のごとくであると推定される。



R. O. Sinnhuber, T. C. Yu, TeChang Yu: Food Research **23**, 626 (1958)

（五十嵐　脩）

鯨肉の栄養価

Nutritive Value of Fin Whale Meat

（昭和 34 年 3 月 16 日受理）

金田尚志 (Takashi Kaneda)　酒井寿恵 (Hisae Sakai)　石井清之助 (Seinosuke Ishii)

The nutritive value of fin whale meat was examined by albino rats. This was slightly inferior to that of beef which was used as control. However, the fatty whale meat taken from a part close to the tail showed higher value than fatty beef.

Ⅰ 緒　言

鯨肉の栄養価について古くは鈴木ら[1]の報告が出されているが，この鯨肉がどのような種類のクジラなのか詳細は不明である。またこの報告以後鯨肉について動物試験は行われていないようである。クジラ類は歯クジラとヒゲクジラに大別され，このうち，マッコウクジラとかイルカなどの歯クジラの肉は不鹸化物量の多い油脂を数%肉中に含んでいる。そのため歯クジラの肉の栄養価はあまり高いとは思われないが，普通食用としているナガスクジラとかシロナガス，イワシクジラなどヒゲクジラの肉は陸上動物肉ないし魚肉にくらべ，それほど劣るとは考えられない。

ところが最近ヒゲクジラの肉もあまり栄養価が高くなく牛肉に劣るという声があり，日本水産研究所より鯨肉の栄養価につき依頼を受けたので動物試験を行つた。

鯨肉の栄養価を論ずる場合，一番問題となるのはその主成分である鯨肉蛋白質がどの程度の栄養価を有するかということであろうが，普通鯨肉を摂取する場合には，当然鯨肉中に含まれる油脂部分も同時に摂取する。そこで，まず最初に鯨肉そのものを摂取した場合の栄養価の程度をシロネズミを用いて検討した。即ち，ナガスクジラの赤肉および尾の身（尾部に近く，油脂含量の多い部分）をシロネズミに給与し，その栄養価の程度を牛肉と比較した。その結果，尾の身の部分は牛赤肉と大差がなく，多脂肪牛肉よりもむしろ成長のよいことを認めた。また鯨赤肉はいくぶん牛肉にくらべ劣るような結果が得られた。本試験は蛋白質の割合をかなり多くして行つたが，次に蛋白質量を減じて行つてみたところ，殆ど同じような結果となつた。さらに蛋白質量を同一とし，これに同一量の鯨油ないし牛脂を添加したところ，鯨赤肉および尾の身を与えたものはいずれも牛肉および牛脂給与群よりも良好な成長を示した。

Ⅱ 実 験 の 部

1. 供試料：

鯨赤肉……南氷洋産冷凍ナガスクジラの赤肉よりグレーズを切りおとしたものを完全に解凍することなく，肉挽にかけ細切後，多量のアセトン中に投入し，脱水すること4回，さらにエーテルで洗滌後乾燥した。またアセトン可溶部は炭酸ガスを通じつつ減圧のもとにアセトンおよび水を除去し，エーテルで振り粗脂肪を分ち，エーテル不溶部は乾燥肉と合し製粉機により粉砕し試料とした。本試料に用いた原料肉は第1表に示すごとく，他のものにくらべ水分量が多いが，これは鯨肉の水分量が多いことに加え，未解凍のためドリップが流出せず，したがつて一般市販品のごとく解凍後のものよりもやや水分が多くなつているといえる。

第1表　供試原料肉の組成

	水分 %	粗脂肪 %	粗蛋白 %	非蛋白 N	灰分 %
鯨赤肉	75.8	2.0	20.3	0.56	0.94
鯨尾の身	64.5	13.8	19.4	0.57	0.82
牛赤肉	67.3	11.6	18.8	0.47	0.89
牛しもふり肉	53.7	26.9	16.3	0.26	0.62

なお溶剤を用いて分離した鯨肉は処理の途中で多少変敗したため動物試験には他の精製ナガス油を使用した。その性質は第2表のごとくである。

第2表　供試肉含有油の一般性状

	酸価	沃素価	鹸化価	過酸化物価 (M.M/kg)
鯨油	1.3	118.9	187.3	32
牛赤肉油	2.9	50.4	191.2	22
牛しもふり油	3.0	44.2	197.0	32

鯨尾の身…… 南氷洋産冷凍尾の身を上記同様に処理した。

牛赤肉……濠洲産バラ肉を肉挽にかけた後上記同様処理した。

牛しもふり肉……含油量が多いため肉挽にかけたものを沸騰水中に投じ煮熟後圧搾し，固形分は以下上記同様処理し，液汁は減圧乾燥後，前記固形分に混合し粉砕した。

2. 動物試験法：第3表に示す飼料をシロネズミに1日1匹当り10gを湯煎上で温水と練つて与え，体重増加を測定するとともにシロネズミの状態を観察した。

第3表　基本飼料組成

白米粉	74	肝油	10 I.U.
マ氏塩	3	試料	20
ビール酵母	3		

（但しカゼイン群はカゼイン 15，大豆油 5）
1日1匹　10g 給与

実験 1. 乾燥鯨肉粉末給与試験：

脱脂乾燥鯨肉に生鯨肉と同一割合の鯨油を添加し，合計が基本飼料中の20%となるようにしたものをシロネズミに給与した。また対照として用いた牛赤肉，牛しもふり肉も同様組成である。48日間の飼育後第4表に示す結果を得た。

第4表の結果をみると，カゼインおよび大豆油群は最も良好な成長を示したが，鯨肉および牛肉給与群の間にはそれほど大きな差異は認められず，シロネズミは与えた飼料をいずれもよく食下した。しかし鯨赤肉を与えた群の成長は他のものに比べいくぶん劣る傾向にあつた。また尾の身を与えたものは牛脂を多く含んだしもふり肉群よりもよく，牛赤肉とそれほど違わない成長を示した。

実験 2. 乾燥肉量を実験1の50%とした場合：

実験1において鯨赤肉のごとく粗脂肪含量の少ないものは基本飼料中20%の乾燥粉末を与えると蛋白給与量がシロネズミの必要量を大幅に上回り，そのため成長がかえつて悪くなつたという恐れもある。そこで前試験に引つづき基本飼料中の乾燥肉＋油脂量を10%とした場合を検討した。その結果は第5表に示すごとく，鯨赤肉群については前試験とほぼ同様の結果が得られた。また尾の身は牛赤肉を上回り，カゼイン群に迫る値を示した。

実験 3. 同一量の蛋白質および油脂を与える試験：

前試験は生肉中に含まれる蛋白質および油脂の割合を基として行つたものであるが，つぎに同一量の蛋白質および油脂を与える試験を行つた。即ち，本試験により鯨ないし牛肉にふくまれる蛋白質および油脂の綜合的な真の栄養価を測定せんとした。

蛋白質給与量は基本飼料中10%，油脂は5%である。

第4表　飼育結果　　昭 33.6.13～8.1

試料名	性別	48日間の体重g 開始時	終了時	増加量	平均体重増加g
脱脂鯨赤肉乾燥粉末＋鯨油（2g）	♂	93	166	73	76.5
	♂	105	182	77	
	♂	103	184	79	
	♂	101	175	74	
	♀	91	163	72	
	♀	97	170	73	
	♀	83	177	94	
	♀	94	164	70	
脱脂鯨尾の身乾燥粉末＋鯨油（2g）	♂	110	196	86	80.7
	♂	105	183	78	
	♂	110	193	83	
	♀	100	182	82	
	♀	91	163	72	
	♀	92	170	78	
	♀	88	174	86	
脱脂牛赤肉乾燥粉末＋牛脂（対照）（2g）	♂	108	186	78	81.1
	♂	118	200	82	
	♂	105	196	91	
	♂	111	195	84	
	♂	105	207	102	
	♀	109	184	75	
	♀	106	172	66	
	♀	101	172	71	
脱脂牛しもふり肉乾燥粉末＋牛脂（対照）（2g）	♂	111	195	84	78.7
	♂	108	181	73	
	♂	100	184	84	
	♂	109	188	79	
	♂	119	203	84	
	♀	90	178	88	
	♀	90	169	79	
	♀	100	166	66	
	♀	100	171	71	
カゼイン 1.5g＋大豆油 0.5g（対照）	♂	102	195	93	87.3
	♂	91	194	103	
	♂	103	204	101	
	♂	96	190	94	
	♂	107	197	90	
	♀	100	174	74	
	♀	100	187	87	
	♀	100	177	77	
	♀	99	168	69	
	♀	90	175	85	

第5表　飼育結果

試料名	性別	23日間の体重g 開始時	終了時	増加量	平均体重増加g
脱脂鯨赤肉乾燥粉末＋鯨油（1g）	♂	166	193	27	33.7
	♂	183	225	42	
	♂	184	229	45	
	♂	175	218	43	
	♀	163	196	33	
	♀	146	193	47	
	♀	170	192	22	
	♀	177	199	22	
	♀	164	186	22	

試料名	性別	29日間の体重g 開始時	終了時	増加量	平均体重増加g
脱脂鯨尾の身乾燥粉末＋鯨油（1g）	♂	196	250	54	43.6
	♂	183	231	48	
	♂	193	240	47	
	♀	170	208	38	
	♀	174	205	31	
脱脂牛赤肉乾燥粉末＋牛脂（対照）（1g）	♂	186	216	30	36.3
	♂	200	236	36	
	♂	196	237	41	
	♂	195	239	44	
	♂	207	255	48	
	♀	184	214	30	
	♀	172	197	25	
脱脂牛しもふり肉乾燥粉末＋牛脂（対照）（1g）	♂	195	232	37	34.8
	♂	181	229	48	
	♂	184	228	44	
	♂	188	220	32	
	♂	203	232	29	
	♀	188	220	32	
	♀	169	204	35	
	♀	161	188	27	
	♀	171	205	34	
	♀	175	205	30	
カゼイン 0.75g＋大豆油 0.25g（対照）	♂	195	229	34	45.3
	♂	194	246	52	
	♂	204	262	58	
	♂	190	242	52	
	♂	197	269	72	
	♀	177	208	31	
	♂	168	204	36	
	♀	175	203	28	

第6表　飼育結果　昭 33.9.10～10.10

試料名	性別	29日間の体重g 開始時	終了時	増加量	平均体重増加g
脱脂鯨赤肉乾燥粉末 1g＋鯨油 0.5g	♂	63	112	49	44.0
	♀	47	98	51	
	♂	80	120	40	
	♀	75	116	41	
	♀	60	97	37	
	♀	64	110	46	
脱脂鯨尾の身乾燥粉末 1g＋鯨油 0.5g	♀	61	99	38	46.0
	♀	49	95	46	
	♂	77	115	38	
	♀	58	100	42	
	♂	49	105	56	
脱脂牛赤肉乾燥粉末 1g＋牛脂 0.5g（対照）	♂	43	93	50	41.8
	♀	52	95	43	
	♂	73	110	37	
	♀	51	92	41	
	♀	65	103	38	
脱脂牛しもふり肉乾燥粉末 1g＋牛脂 0.5g（対照）	♀	53	95	42	39.0
	♂	54	99	45	
	♂	67	102	35	
	♀	81	110	29	
	♀	51	100	49	
	♀	64	98	34	
カゼイン 1g＋大豆油 0.5g（対照）	♀	48	101	53	46.7
	♀	86	120	34	
	♀	56	98	42	
	♂	59	115	56	
	♂	52	100	48	

第6表に示すごとく，蛋白質および油脂の給与量を一定として試験を行うと鯨肉給与群は牛肉を与えたものよりもかなり良好な成長を示し，とくに尾の身はカゼイン群に匹敵する値となつた。

Ⅲ　考　　察

以上の結果より考察するに，鯨肉の栄養価は牛肉に比較しそれほどひどく劣るものではなく，とくに値段の点を考えれば国民栄養に貢献する食品といえよう。

全試験を通じ，尾の身は鯨赤肉を上回る値を示したが尾の身と赤肉とでは蛋白質部分の栄養価がそれほど違うとは考えられず，結局その理由は油脂含量の差に帰すべきであると考える。即ち，第6表の結果からも明らかなごとく，鯨油は牛脂などにくらべるとはるかに良好な栄養価を示している。このことは既に筆者ら[2]により古くから認められていることであるが，新鮮な鯨肉中に含まれている未変化な酸敗を受けておらぬ鯨油はかなり高い栄養価を示すものである。また牛脂はシロネズミの体温よりも融点が高く，食下しても十分消化吸収されないと考えられる。

巷間伝えられる乾燥鯨肉の栄養価が乾燥牛肉に劣るということは，鯨肉や牛肉をそのまま乾燥したため，鯨肉の場合は含有油の沃素価が牛脂にくらべるとはるかに高いので含有油の酸敗が一層甚しかつたからと思われる。即ち，筆者ら[3]は不飽和油脂が酸敗した場合，過酸化物を生じ栄養価が低下するばかりでなく毒性さえも生ずることを認めているが，鯨肉を脱脂することなく直接乾燥せしめると当然含有油は変敗し，栄養価は低下すると思われる。そのため，このような処理を行つた乾燥鯨肉は新鮮なものに比べると栄養価は下り，その値をもつて真の鯨肉の栄養価と断ずるのは大きな危険をともなうといえよう。

Ⅳ　摘　　要

シロネズミを用い南氷洋産鯨赤肉および尾の身の栄養価を成長試験により検討した。その結果鯨赤肉は対照として用いた牛肉にくらべ多少体重増加が劣り，尾の身は多脂肪牛肉よりもよい結果が得られたが，その差はごく僅かであり，鯨肉は牛肉とほぼ同様の栄養価値を有する食品であることを認めた。

本研究を行うにあたり，終始御指導を賜わつた東秀雄博士，動物試験に尽力された荒井君枝氏，及び試料を提供された日本水産研究所に厚く謝意を表する。

文　　献

1）鈴木ら：理研彙 **1**, 282（1923）
2）金田ら：東海水研報 **12**, 1～73（1955）
3）金田ら：日水誌 **19**, 171（1953）. **20**, 50, 658（1954）
栄養と食糧 **7**, No. 4（1954）

（東海区水産研究所）

THE MECHANISM OF THE SLIME FORMATION ON SUGARED KAMABOKO. III. IDENTIFICATION OF DEXTRAN BY MEASURING THE VELOCITY CONSTANT OF ACID HYDROLYSIS AND BY OXIDATION WITH SODIUM META-PERIODATE FOR 'NETO' COMPOUND

Hitoshi Uchiyama and Keishi Amano
(Tokai Regional Fisheries Research Laboratory)

Received June 15, 1959

In the preceding papers,[1)2)] a problem of surface spoilage of Kamaboko producing slime or "Neto" was described as to the mother substance and causative bacteria being considered to promote this particular spoilage, in which the writers assumed that the slime or "Neto" would be dextran, a kind of glucose polymer characterized with its 1,6 glucosidic linkage. The facts that brought this conclusion could be as follows; the "Neto" is unexceptionally formed on Kamaboko containing cane sugar as a seasoning stuff, which is never produced on the food added by glucose, fructose, xylose and arabinose instead of sucrose. In addition, neither mixture of glucose and fructose nor the phosphorylated form of these sugars do fulfil requirement of the problem organism for dextran production, even both hexoses ought to be considered as satisfactory energy source. On the other hand, with progress of formation of "Neto" on sugared Kamaboko, sucrose in the Kamaboko is consumed rapidly accompanied with the increase of reducing sugar as degradation product of sucrose by bacteria. From these experimental results, the writers presumed that a polymerative decomposition of sucrose would take place in sugared Kamaboko and this slimy, transparent "Neto" should be a certain carbohydrate polymer like dextran. Besides this, a strain of *Leuconostoc*, a popular dextran forming bacteria has been isolated from spoiled sugared Kamaboko. This "Neto" material, purified by a repeated precipitation with methanol for three times, was as well hydrolized with dextranase prepared from *Penicillium funiculosum*, as done for clinical pure dextran. The end products from the "Neto" decomposed by the dextranase, were identified as isomaltose and isomaltotriose by paper chromatography.

In order to add further proof for our conclusion, in this report, another identification test specific for dextran by using sodium-metaperiodate and measuring the velocity constant of hydrolysis for a standard clinical dextran will be described.

In 1952, Kobayashi[3)] has reported that the rate of hydrolysis of polysaccharides like starch and dextran with 10 N H_2SO_4 under various temperatures, in which he mentioned the velocity constant of hydrolysis calculated on the basis of unimolecular reaction, was about 10 times at 40°C and about 6 times at 60°C larger for amylose,

Contribution B No. 318 from the Tokai Regional Fish. Res. Lab.

which involves 1, 4 glucosidic linkage, than dextran. And, in 1953, KOBAYASHI[4] also reported that the ratio of amount between 1,4 and 1,6 glucosidic linkage among different kinds of dextran, by means of measuring the amount of formic acid derived from dextran due to oxidation with sodium meta-periodate which distinguished the 1,6 linkage from the 1,4 linkage.

Meanwhile, McCLESKEY et al[5] (1947) showed that most commonly encountered species which forms dextran from sucrose was *Leuconostoc mesenteroides* including over a hundred strains, and he grouped these organisms into four types; A, B, D and F chiefly by their colony characteristics. In 1956, JEANES[6] examined the ratio of 1,6 and 1,4 linkage in samples of dextran obtained from the culture of these four types of *Leuconostoc mesenteroides* and disclosed there should be a wide variation in the number of α-1,6 glucosidic linkage.

The idea in these findings mentioned above was adopted as a means to scrutinize the nature of 'Neto' produced by Kamaboko spoilage.

Materials and Methods

'Neto' sample

'Neto' sample used was prepared in the same method described in the previous reports.

Amylose and Amylopectin

Amylose and amylopectin used in this experiment were supplied by the courtesy of Dr. J. NIKUNI, Prof. of Osaka University. These staffs were said to be prepared from potato and sweet potato.

Determination of reducing sugar obtained by acid hydrolysis of 'Neto' sample.

Acid hydrolysis of both 'Neto' and amylose was carried out at the temperature of 60±0.1°C. kept in a water bath. After 'Neto' sample and sulphuric acid were heated to this temperature separately, both materials were mixed in an Erlenmeyer flask of 100 ml. with glass plug. The reaction was proceeded in a condition of 0.2 per cent of 'Neto' sample with 10 N sulphuric acid. At the interval of every 60 minutes, the mixture subjected to hydrolysis was pippeted from the flask and placed in a beaker and then neutralized with 10 per cent sodium hydroxide solution, and reducing sugar thus remained in the sample was determined by HANES method and figured out in terms of glucose.

In another experiment, total amount of reducing sugar in both 'Neto' and amylose was determined after complete hydrolysis with 1 N H_2SO_4 solution for the account of calculating the rate of hydrolysis. In the case of 'Neto', the hydrolysis was undertaken by heating in a oil bath kept between 120 and 130°C for 8 hrs. and for amylose, in a boiling water bath for 2 hrs. After both 'Neto' and amylose was hydrolized completely, the hydrolyzate was neutralized with sodium hydroxide solution and also

reducing sugar derived in such a way was determined by HANES method.

Calculation of the velocity constant of hydrolysis of 'Neto'

The value of velocity constant of acid hydrolysis of 'Neto' and amylose was computed by the following formula,

$$k=\frac{1}{t}\log_{10}\frac{c}{c-x}$$

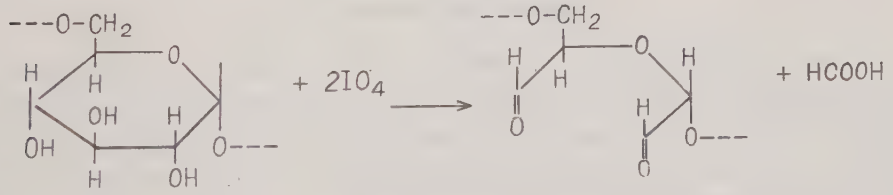
where c is the amount of total reducing sugar in 'Neto' or amylose, x for the amount of reducing sugar released from polymers at a certain time during hydrolysis under the given condition, t for the time in minutes.

Determination of formic acid produced by oxidation of 'Neto' with sodium meta-periodate

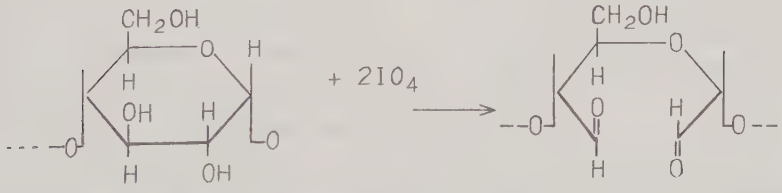
Formic acid produced due to periodate oxidation of the polysaccharide was determined by the procedure described by SMITH et al.[7] 'Neto', amylose, amylopectin and clinical pure dextran are dissolved in 2 per cent solution of sodium chloride separately and each solution was cooled to 5–6°C by standing in a refrigerator. To this solution, sodium meta-periodate was added in an amount of four times more than the amount considered to be equivalent to oxidize whole linkage. Then, the solution was shaked by a reciprocal shaker in a refrigerator kept at 5–6°C for 24 hours. In the end of the period of standing, 10 ml. portion of the solution was pippeted and a 0.1 ml. part of conc. ethylenglycol was added in order to reduce all the remaining meta-periodate. After standing for 30 minutes, the solution was titrated with 0.01 N sodium hydroxide using phenol-red indicator under perfusion of nitrogen gas. The value of formic acid can be then obtained from the consumption of 0.01 N sodium hydroxide solution.

Periodate oxidation of polysaccharide

It has been admitted that one mole of formic acid should be formed from one mole



α-1,6 liked glucosidic residue



α-1,4 linked glucosidic residue

Fig. 1. Proposed reaction of periodate oxidation for dextran and amylose.

of anhydroglucose, which locates in dextran as three adjacent hydroxyl group with 1,6 glucosidic linkage, by oxidation process with periodic acid or periodate, while, in the case of polysaccharide likes amylose, which involves none of these adjacent hydroxyl group because of its 1,4 glucosidic linkage, thus periodate would not give formic acid by oxidation.

Further, for dextran, two moles of periodate are required to release each mole of formic acid (See Fig. 1).

Therefore, a possibility of formic acid liberation from polysaccharide with periodate would give whether or not there could be 1,6 glucosidic linkage in structure of the polymer.

Preparation of sodium periodate.

As any commercial reagent could not be available, sodium periodate used in this experiment was prepared according to LANGLOIS method by using sodium para-iodate as a starting material. The following reaction would proceed by giving sodium iodate together with sodium nitrite and water.

$$Na_3H_2IO_6 + 2HNO_3 \longrightarrow NaIO_4 + 2NaNO_3 + 2H_2O$$

Quantitative analysis of sodium meta-iodate.

To a 10 ml. portion of the mixture, withdrawn from Erlenmeyer flask at the end of oxidation reaction, 5 ml. of saturated sodium bicarbonate solution, 5 ml. of 0.1 N sodium arsenite and 5 ml. of 0.15 N sodium iodide were added in this order, and after well shaken, the mixture was kept for about 30 minutes in room temperature. And then, sodium arsenite remained in the mixture was titrated with 0.02 N iodine solution. The concentration of iodine solution was carefully checked every day with 0.05 N solution of sodium thiosulphate.

Results and discussion

As shwn in Figures 2, 3, 4, it is obvious that the velocity of acid hydrolysis of 'Neto' was lower than that of amylose at 40°C, and clinical dextran was found most resistant to hydrolysis. The trend of susceptibility for hydrolysis among three samples is similar even under increased temperature, though amylose is very labile at 60°C. This implies that the number of 1,6 glucosidic linkage contained in 'Neto' should be less than that of clinical pure dextran and also it coincides with the observation on viscocity of these two kind of dextran reported in the previous paper.

Table 1. The velocity constant of acid hydrolysis of 'Neto' dextran and amylose (60°C±0.1)

Materials	$k(min^{-1})$
Amylose	0.00756
Dextran	0.00132
'Neto'	0.00267

Table 1, in which the velocity constant of hydrolysis for three samples at 60°C is indicated, gives about 5.7 times

higher rate for amylose than dextran and nearly 2 times high rate for 'Neto' from the value for clinical pure dextran.

In Figure 5, rate of formic acid formation for each sample with treatment of

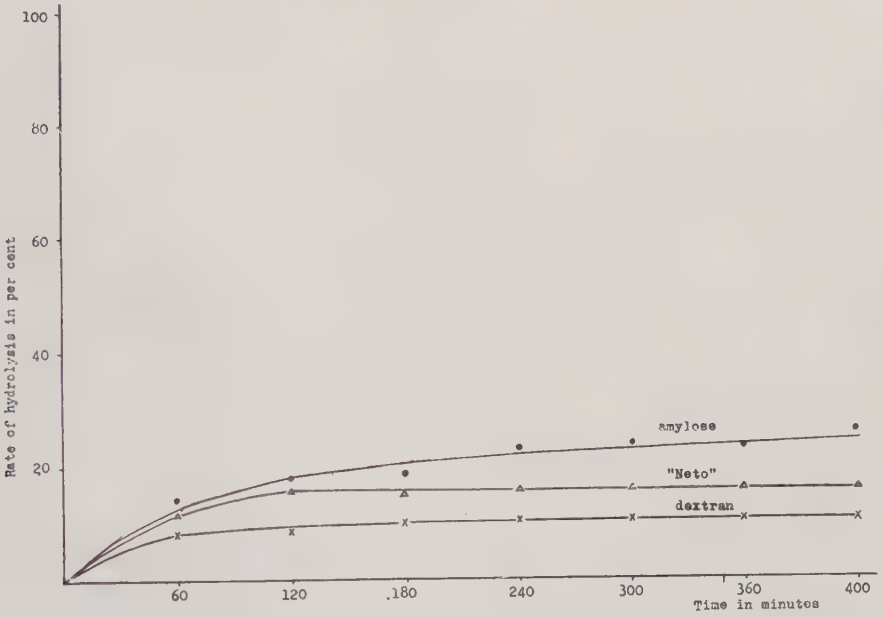


Fig. 2. Rate of acid hydrolysis of amylose, dextran and "Neto" at 40°C±0.1°C.

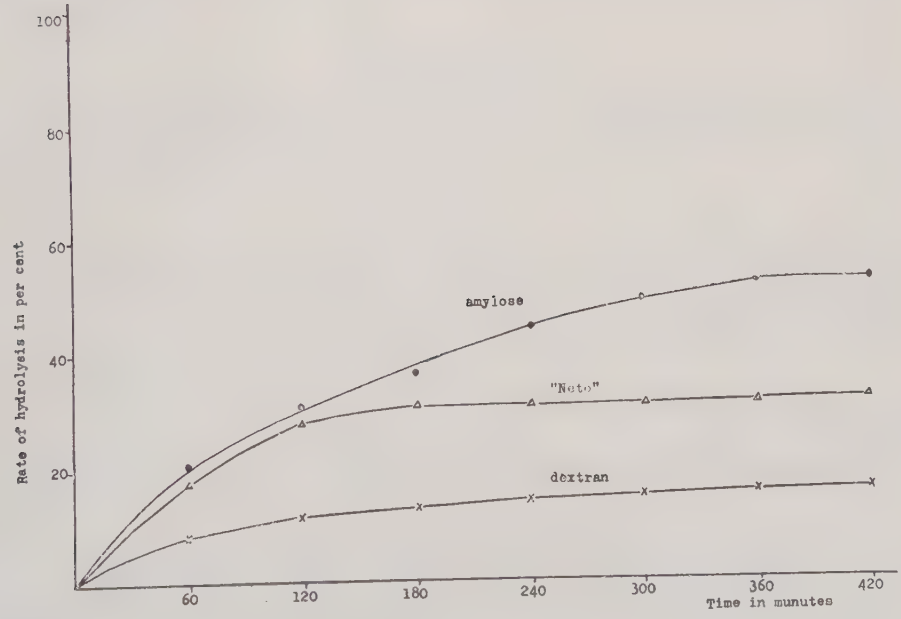


Fig. 3. Rate of acid hydrolysis of amylose, dextran and "Neto" at 50°±0.1°C.

periodate is given. Most abundant production of formic acid can be traced in clinical dextran and the middle is 'Neto', while least amount of formic acid is liberated from amylose.

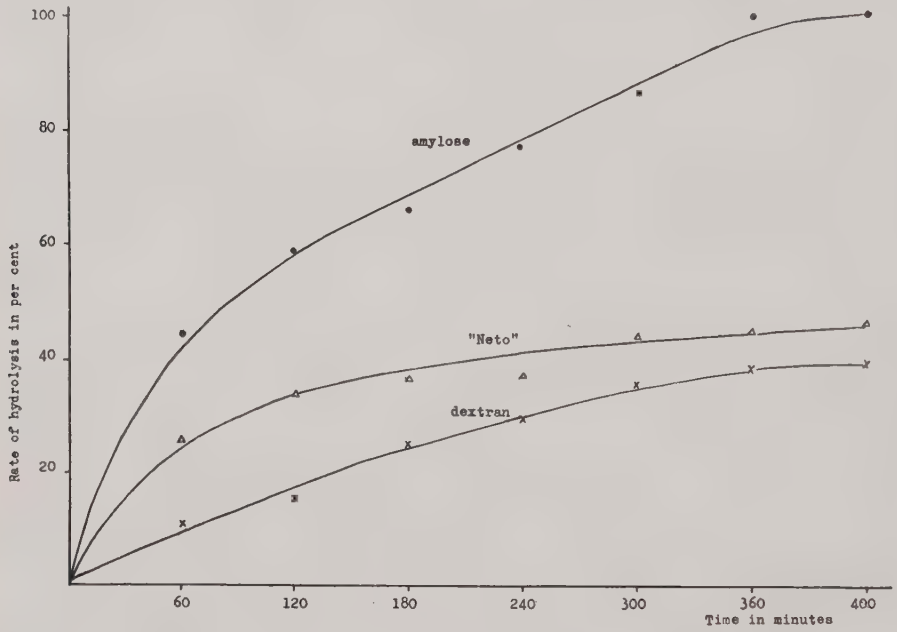


Fig. 4. Rate of acid hydrolysis of amylose, dextran and "Neto" at 60±0.1°C.

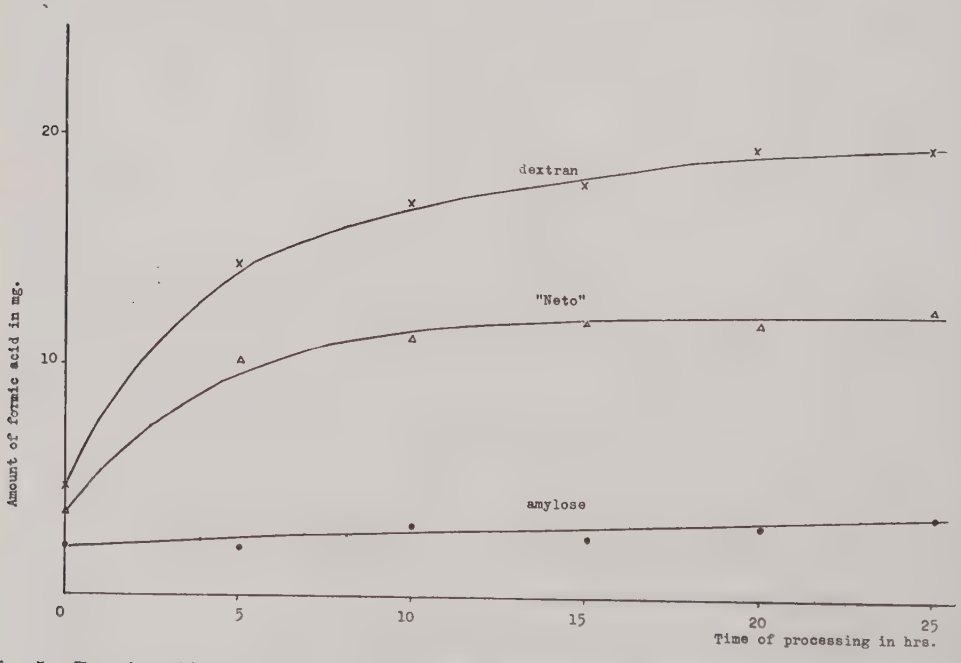


Fig. 5. Formic acid production from amylose, dextran and "Neto" by means of periodate oxidation. (6−10°C)

Table 2. Periodate oxidation of 'Neto', dextran, amylopectin and α-methylglucoside

Materials	Formic acid produced in mole per mole of anhydroglucose	Periodate consumed in mole per mole of anhydroglucose
'Neto'	0.58	1.66
Dextran	0.78	1.88
Amylopectin	0.08	0.66
α-Methyl glucoside	1.00	2.03

As will be seen in Table 2, a control run for α-methylglucoside indicates that one mole of formic acid can be obtained from exactly one mole of anhydroglucose, where 2.03 moles of sodium periodate are required to oxidize one mole of the anhydroglucose. These values well agree with theoretical figures.

Meanwhile, amount of formic acid from clinical dextran is 0.78 moles per one mole anhydroglucose where the consumption of periodate is in a level of 1.88 moles. And, 0.58 mole of formic acid was produced from one mole of anhydroglucose by consuming 1.66 mole of periodate. The value is obviously lower than the case of clinical dextran, which indicates a smaller percentage of 1,6 glucosidic linkage in 'Neto' than in clinical dextran. This evidence presumably implies that the number of 1,3 or 1,4 linkage in 'Neto' should be higher than in dextran, though the major portion of the binding consists of 1,6 linkage.

However, higher amount of formic acid produced from 'Neto' as well as the higher rate in consumption of periodate involved in this sequence than the finding of amylopectin would suggest that 1,6 linkage still remains principal part in the structure of 'Neto' compound.

Acknowledgement

The writers with their heartful thanks to Dr. Tsuneo Kobayashi of Tokyo University for his kind advice throughout the work.

Summary

1. The velocity constant of hydrolysis of 'Neto' showed about 2.8 times as higher than that of amylose at the temperature of 60°C, which suggests a majority of glucosidic linkage in 'Neto' should be composed of 1,6 form.

2. By oxidation test with periodate a comparatively large amount of formic acid was produced from a unit mole of anhydroglucose in 'Neto compound, which could be another proof to indicate the presence of more 1,6 glucosidic linkage, a characteristic of dextran.

3. From above two finding, together with the evidences already mentioned in our other reports the 'Neto' obtained from spoiled sugared Kamaboko would be determined as a dextran.

References

1) H. Uchiyama and K. Amano: Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, **23**, 716–722, (1958).
2) H. Uchiyama and K. Amano: Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, **24**, 840–848 (1959).
3) T. Kobayashi: Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, **25**, 424–426 (1952).
4) T. Kobayashi: Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, **27**, 33–37 (1953).
5) C. S. McClesky: Journal of Bacteriology, **54**, 697–708 (1947).
6) A. Jeanes: Journal of Bacteriology, **72**, 167–173 (1956).
7) D. Glick: 'Methods of Biochemical Analysis', (1945), 190–194.

ねり製品の内部腐敗に関する研究—IV.
Bacillus 属菌の繁殖におよぼす培地初期電位の影響

横 関 源 延

(1959 年 7 月 6 日受理)

STUDIES ON THE INTERNAL SPOILAGE OF FISH JELLY PRODUCTS—IV. EFFECT OF THE INITIAL OXIDATION-REDUCTION POTENTIAL OF THE MEDIUM UPON THE GROWTH OF *BACILLUS* SPECIES

Motonobu Yokoseki*

It has been shown in the preceding paper that interior portion of fish jelly products (Kamaboko) or fish sausage is being kept in a condition of rather low oxidation-reduction potential, Eh value likes range between −0.100 and −0.250 volts.

Taking into consideration of this factor, the present report dealt with observation of the growth under different level of oxidation-reduction potential for some varieties of *Bacillus* group including both type strains and the organisms isolated from commercial fish sausage.

In a test with glucose-agar medium, 11 strains from 21 strains of *Bacillus* species failed to grow where the initial Eh value was adjusted to −0.2 volt with thioglycolic acid, however, none of the strain of *Bacillus megaterium* tested could indicate growth. These findings were never shifted to any other pattern, even when yeast extract was added to the medium, but most strains lost ability to grow on the medium lacking glucose, while in the medium containing starch in stead of glucose, the majority of strains showed fairly good growth as in glucose-agar medium. These results suggest that *Bacillus* species normally need certain fermentative sugar for their growth in low potential condition.

The lowest Eh value of the glucose-agar medium which enables growth of these strictly aerobic *Bacilli* was found to be near +0.20 volt for both spores and vegetative forms. On the other hand, in a medium without glucose, these microorganisms required a condition in which the minimum Eh value should be kept above +0.24 volt.

The growth of facultative aerobic strains, capable to grow even at low potential, was also affected by the change in oxidation-reduction potential of media. Under circumstance of high potential such as the Eh above +0.23 volt, facultative aerobes showed much vigorous development, but if the potential of medium would turn to negative region, these strains could grow only in less extent. And also, some strains of this group were no more able to grow at the Eh below −0.25 volt and in addition, the colonies formed in agar medium became to decrease in their number in accordance with reduction of the potential.

前報[1]において，ねり製品内部はハンペン等の多泡性の製品を除き，一般にその酸化還元電位 (O-R. P) が低く，Eh がマイナス側にあることを明らかにした。

細菌の繁殖に対する O-R. P の影響は特に偏性嫌気性菌について研究されており，多数の報告[2)3)4)5)6)]がある。一般に偏性嫌気性菌が旺盛な発育を示すためには培地の初期電位が Eh −0.1～−0.2 ボルト程度の低い条件が必要のようである[5)6)7)]。一方好気性菌の繁殖と酸素濃度あるいは電位との関係についても二，三

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab. Chuō-ku, Takyo, Japan).

東海区水産研究所業績 B 第 319 号

の報告が見られるが[8)9)10)11)]，その関係は明確にされていないように思われる。

ところでねり製品類の加熱直後に主として残存する菌は，特に加熱温度の低い場合は別として，一般に有芽胞桿菌が主であることはその耐熱性の点から考えて当然である。これら有芽胞桿菌のうち偏性嫌気性菌である *Clostridium* 属の残存する頻度はそう多くはないと考えられる[12)13)14)]。そこで今回は *Bacillus* 属菌の繁殖と O-R. P との関係について，主として固体培地を用いて実験したのでその結果を報告する。

実 験 方 法

(1) 酸化還元電位の測定

O-R. P の測定には電気的な方法と酸化還元指示薬を用いる方法とを併用した。電気的な方法は前報[1)]で報告したとおりである。指示薬法は使用した実験のところで説明することにする。

(2) 使 用 菌 株

実験に使用した菌株はつぎの 22 株である。

1) *Bacillus subtilis* (F)
2) *Bacillus subtilis* Bact 2-8
3) *Bacillus subtilis* PCI 219
4) *Bacillus subtilis* IAM Bact 4-1
5) *Bacillus subtilis* (MY)
6) *Bacillus mesentericus* (F)
7) *Bacillus megaterium* (F)
8) *Bacillus megaterium* 10778
9) *Bacillus megaterium* Bact 1-12
10) *Bacillus megaterium* (MY)
11) *Bacillus cereus* IAM Bact 4-6
12) *Bacillus cereus* (MY)
13) *Bacillus cereus* var. *mycoides* No. 5
14) *Bacillus cereus* var. *mycoides* IFO 3039
15) *Bacillus cereus* var. *mycoides* IAM
16) *Bacillus coagulans* (MY)
17) *Bacillus firmus* (MY)
18) *Bacillus lentus* (MY)
19) *Bacillus circulans* (NN)
20) *Bacillus circulans* (YE)
21) *Bacillus circulans* (HEM 2)
22) *Clostridium sporogenes* NCA, PA 3679

このうち 2), 3), 4), 9), 11), 14), 15) は東大応用微生物研究所，8), 13), 22) は予防衛生研究所，1), 6), 7) は千葉大腐敗研究所よりそれぞれ分与されたものである。また 5), 10), 12), 16), 17), 18) は著者が魚肉ソーセージの加熱直後の製品より分離した株[12)15)]，19), 20), 21) は魚肉ソーセージの軟化変敗の原因菌として，軟化部位より分離した株である[16)]。

(3) 使 用 培 地

つぎに示す組成の培地を基本培地とし，目的によつて，これにブドー糖，澱粉等を添加した。

ペプトン 10 g，肉エキス 10 g，食塩 5 g，寒天 15 g を蒸溜水 1 *l* に溶解し，pH 7.0 に調製する。殺菌は総て 15 ポンド 15 分である。

(4) 酸化還元電位の調節

上記培地にチオグリコール酸あるいはチオグリコール酸ソーダを 0.02～1% 添加して培地の電位を調節した。

(5) 芽胞懸濁液の調製

基礎培地に硫酸マンガン 1 ppm を添加してシャーレに固め，これに寒天斜面 24 時間培養の細菌を全面に塗抹した。30°C 10 日間培養した後殺菌蒸溜水を加えて菌苔を掻き取り，硝子球を入れた殺菌共栓付き三角フラスコに移して十分に振盪，胞子塊を破潰した後，東洋濾紙 No. 5 A で沪過して胞子塊を除く。これを遠心分離器を用いて蒸溜水で 2 回洗浄した後，65°C 30 分加熱して残つた栄養細胞を殺菌し，4°C の冷蔵庫に保存する。使用前再び 65°C 30 分の heat shock を行なつてから用いた。

(6) 栄養菌体懸濁液の調製

基礎培地にブドー糖 1 % を加えた液体培地を L 字型試験管に分注殺菌した後，これに 24 時間斜面培養の菌体を一白金耳接種し，MONOD の振盪培養装置を使用して 30°C 6 時間振盪培養した。培養後遠沈して菌

体を集め，さらに殺菌生理的食塩水で1回洗浄した後，再び殺菌生理的食塩水に懸濁して直ちに使用した。

実 験 結 果

1. 種々の *Bacillus* 属菌の低電位における発育

できるだけ多数の *Bacillus* 属菌を集め，これらが低電位の条件においてどの程度の発育を示すかを実験した。すなわち基本培地にブドー糖1％を添加し，さらにチオグリコール酸を加えて培地の Eh を大体 −0.2 ボルト，pH 7.0 に調節した寒天培地を使用した（チオグリコール酸 0.05%を要する）。この培地を試験管に 20 cc 宛分注して殺菌後，48°C に冷却しておき，これに普通寒天斜面培地に 34°C 48 時間培養した菌を pH 7.0 の M/15 燐酸塩緩衝液に懸濁して適当に稀釈した菌浮游液 1 cc を，培地 1 cc 中 10^3〜10^4 になるように接種してから急冷凝固させる。培地の乾燥を防ぐために試験管にゴム栓をして，25°C と 34°C に培養した。各菌株毎に3本の試験管を用いた。培養中は毎日試料を取り出して観察したが，25°C 培養は 34°C 培養より発育が多少遅れる程度で結果は同様であつた。その結果を Table 1 の第1欄に示した。

すなわち使用した菌株は全部で 21 株であつて，このうち *B. subtilis* 5株中3株，*B. megaterium* 4株全部，*B. cereus* 2株中1株，*B. mesentericus*, *B. firmus*, *B. lentus* 等 11 株は電位の高い培地表面においては，きわめてよく繁殖するにも拘わらず，低電位条件にある培地深部では全く発育が認められな

Table 1. The growth of *Bacillus* strains in the negative side of oxidation-reduction potentia (Eh = −0.2 volts) of agar media after 10 days incubation at 34°C.

Bacillus strains tested	Growth in surfase	Growth in depth			
		Basal medium			
		Added glucose	Added glucose and yeast extract	Not added	Added starch
B. subtilis (F)	##	+	+	+	+
B. subtilis Bact 2–8	##	##	##	±	##
B. subtilis PCI 219	##	−	−	−	−
B. subtilis IAM Bact 4–1	##	−	−	−	−
B. subtilis (MY)	##	−	−	−	−
B. mesentericus (F)	##	−	−	−	−
B. megaterium (F)	##	−	−	−	−
B. megaterium 10778	##	−	−	−	−
B. megaterium Bact 1–12	##	−	−	−	−
B. megaterium (MY)	##	−	−	−	−
B. cereus IAM Bact 4–6	##	##	##	+	+
B. cereus (MY)	##	−	−	−	−
B. cereus var. *mycoides* No. 5	##	##	##	−	−
B. cereus var. *mycoides* IFO 3039	##	##	##	+	##
B. cereus var. *mycoides* IAM	##	##	##	+	##
B. coagulans (MY)	##	+	±	−	−
B. firmus (MY)	##	−	−	−	−
B. lentus (MY)	##	−	−	−	−
B. circulans (NN)	##	##	##	−	##
B. circulans (YE)	##	##	##	−	##
B. circulans (HEM 2)	##	##	##	±	##

かつた。残り 10 株は培地表面より，はるかに発育は劣るが，明らかに培地深部においても肉眼で認められる程度の発育を示した。

最近 *Bacillus* 属菌の芽胞の発芽生理について，相当詳細な研究が行なわれている。それによると芽胞の生長（いわゆる germination およびそれに引続いて起る outgrowth の過程を含んでいる）のための栄養要求は栄養細胞の発育のための栄養要求より厳しいとの報告がみられる[17)18)]。そこで低電位の条件で発育を示さなかつた菌株の接種懸濁液が，たまたま芽胞だけであつたかも知れないとの疑問が生じたので，これ等菌の 34°C 6時間培養の菌を，栄養体の細胞のみであることをたしかめて，同様に接種し，培養してみたが結果は前と全く同様であつた。そこでつぎに，このような菌の低電位における発育には特に栄養要求が厳しくなり，特殊なビタミン要求が生ずることも考えられるので，基礎培地の肉エキスを酵母エキス 0.5%に替え，ブドー糖 1 %を添加した培地に接種してみたが，第 2 欄に示したように，酵母エキスを加えない場合と全く同じ結果が得られた。したがつて，これら低電位において発育しない菌は本質的に低電位には生育できない菌と見なされる。すなわち偏性好気性菌である。

嫌気的条件において，醱酵性の糖類の有無は細菌の発育に対し，エネルギー源として，きわめて重要であることは更めて論ずるまでもない。そこで糖類を含まない基礎培地に試験菌を接種してその発育を観察したところ，Table 1 第 3 欄に示したように，大部分の菌株は糖を加えた場合に比較して，その発育が微弱になり，特に *B. cereus* var. *mycoides* No. 5, *B. circulans* (NN) および (YE) 等の菌株は，培地表面での繁殖はきわめて旺盛であるにも拘わらず，全く生長を示さなくなつた。このような事実は一般に *Bacillus* 属菌が低電位で発育するためには糖類が必要であることを示している。

ねり製品の製造には，たとえ糖を加えない場合にも澱粉を添加することが普通である。そこでブドー糖の代りに澱粉がエネルギー源としての働きがあるかどうかを実験した。その結果を Table 1, 第 4 欄に示した。表によると大部分の菌はブドー糖を加えた場合と同様な繁殖を示したが，*B. cereus* IAM Bact 4–6, *B. cereus* var. *mycoides* No. 5 および *B. coagulans* (MY) は糖を加えなかつた場合と全く同様であつて，これらの菌が低電位においては澱粉を利用し得ないことを示している。

2. 偏性好気性菌の発育できる下限 Eh について

以上の結果によると，*Bacillus* 属には相当豊富な栄養を与えても，ある電位以下の低電位では全く繁殖を示さない菌株のあることが明らかとなつた。このような偏性好気性の *Bacillus* 菌株は，どの程度まで電位が下つたなら発育ができなくなるのかを明らかにしたいと考え，種々検討した結果つぎのような方法によつて確めた。

すなわち基礎培地およびこれにブドー糖 1 %を加えた培地を用い，径の一定な試験管に 10 cc づつ分注して殺菌する。この培地を加熱溶解して 48°C に保つておき，これに Table 2 に示した 7 種類の酸化還元指示薬を 0.1%水溶液として，適当量（僅かに呈色する程度，普通 3～5 滴）各々 3 本づつの培地に混入し，

Table 2. Range of colored zone from surface of agar media (pH 7.0) containing various redox indicators after 18 hours incubation at 30°C.

Redox indicators	E_0' (Volts) at pH 7.0	Nutrient glucose agar medium		Nutrient agar medium
		Liquid paraffin	No seal	
0–Chlorophenol indophenol	+0.233	0.15 cm	0 cm	0.93 cm
2.6–Dichlorophenol indophenol	+0.217	0.24	0.08	1.09
Thymol indophenol	+0.174	0.77	0.45	1.32
1–Naphthol–2–sulphonate indophenol	+0.123	0.81	0.59	1.65
Methylene blue	+0.011	1.00	0.74	—
Indigo tetrasulphonate	−0.046	1.04	0.76	Whole colored
Neutral red	−0.325	Whole colored	Whole colored	Whole colored

直ちに冷水にて冷却凝固させる。また別にこの上に殺菌流動パラフィンを 2 cm の厚さに重層したものを同時に用意する。

培地に加えた酸化還元指示薬のうち，加糖培地では indigo tetrasulphonate，無糖培地では 1-naphthol-2-sulphonate indophenol より高い標準電位を持つた指示薬は完全に脱色して無色となり，加糖培地では neutral red のみが着色する。このことは加糖培地の電位が Eh で −0.046 ボルトと −0.325 の間にあることを示している。事実電気的に測定したこの培地の電位は Eh −0.048 ボルトであつた。これらを 30°C に放置しておくと，空気中の酸素が培地表面から浸入し，徐々に電位が上昇する。それにつれて各指示薬は表面から深部に向つて着色することになる。流動パラフィンを重層した試験管は培地表面が直接空気に接触していないので，着色する速度がはるかに遅れるわけである。Table 2 は表面からの各酸化還元指示薬の着色層の厚さを測定した結果であつて，3 本の試験管の測定値はよく一致した。

この結果からみても流動パラフィンを重層すると，電位の上昇は重層しないものに比べ，はるかに遅れることが明らかである。また糖を加えない培地の電位は糖を加えた培地に比較して電位の上昇が速かである。

指示薬を添加すると同時に，別の試験管に芽胞並びに栄養菌体の浮游液を 10 cc の培地に 3.0×10^3 になるように加えて，一様に懸濁させて後冷却凝固させる。このような試験管を各菌種について 3 本づつ作る。また指示薬の場合と同様に流動パラフィンを重層したものも作つた。このようにして用意した芽胞および栄養菌体入試験管を指示薬入試験管と同時に 30°C に培養し，2 日間にわたり指示薬の着色層を測定すると同時に，芽胞および栄養菌体を接種した試験管についても表面からの発育層の長さを測定する。すなわち発育の最深部の位置を測定するわけである。一方指示薬の着色層からこの発育最深部の O-R. P（発育下限 Eh）を測定することができる。培地の電位によつて偏性好気性の *Bacillus* の発育が規制されるとすれば，流動パラフィンを重層した試験管の発育下限 Eh と重層しない試験管の発育下限 Eh とが一致するはずである。実験の結果によるとこの両者は実によく一致した。これらの結果を Table 3 に示した。

結果から明らかなように，一般に偏性好気性の *Bacillus* は糖を加えた培地においては大体 Eh +0.2 ボルト以下に電位が下ると発育が阻止され，糖を加えない培地では少なくとも Eh +0.24 ボルトで発育が阻止される。

このように糖を添加した場合は，しない場合より低い電位でも生育できる。これは窒素化合物の酸化に関与する酵素系が糖の酸化に関与する酵素系に比べて高い電位を必要とするからであろう。芽胞の場合と栄養細胞の場合を比較すると，その発育下限 Eh はほとんど変りなく，芽胞に比べて栄養細胞の繁殖が特に低電位でも可能であるという証拠は見当らない。例外として *B. coagulans* (MY) 1 株が芽胞は Eh +0.174 ボルト以上の電位を必要とするのに，栄養細胞は Eh −0.325 ボ

Table 3. The negative limit of oxidation-reduction potential required for the growth of strictly aerobic *Bacillus* strains.

1. Inoculum: spore

Bacillus strains tested	Eh in volts	
	Nutrient glucose agar medium	Nutrient agar medium
B. megaterium (MY)	+0.206	over +0.240
B. lentus (MY)	+0.206	over +0.240
B. subtilis (MY)	+0.190	over +0.240
B. cereus (MY)	+0.190	+0.208
B. firmus (MY)	+0.206	over +0.240
B. coagulans (MY)	+0.174	+0.208

2. Inoculum: vegetative cell

Bacillus strains tested	Eh in volts	
	Nutrient glucose agar medium	Nutrient agar medium
B. megaterium (MY)	+0.200	over +0.240
B. lentus (MY)	+0.200	over +0.240
B. subtilis (MY)	+0.200	over +0.240
B. cereus (MY)	+0.200	over +0.240
B. firmus (MY)	+0.200	over +0.240
B. coagulans (MY)	below −0.325	+0.233
B. subtilis PCI 219	+0.206	over +0.240
B. megaterium 10778	+0.200	over +0.240

ルト以下でも繁殖する。これは *B. coagulans* (MY) の栄養菌体が芽胞とは異なる糖代謝系を獲得したものと思われる。

3. 通性好気性菌の発育に対する電位の影響

低電位においても発育できる，いわゆる通性好気性の *Bacillus* に対する培地初期電位の影響を調べるために，固体培地を用いて実験を行なつた。使用培地は基礎培地にブドー糖1％を添加し，これにチオグリコール酸ソーダを加え，あるいはその他の方法を用いて培地の電位を調節した。すなわち Eh +0.23 以上の高電位条件を作るにはチオグリコール酸ソーダを加えない培地 15 cc を内径 7.2 cm のシャーレに分注し，この電位は指示薬法で測定した。Eh −0.04 ボルトの条件は，やはりチオグリコール酸ソーダを添加しない培地 15 cc を試験管に高層に固め，流動パラフィンを 2 cm の厚さに重層した。それ以下の Eh はチオグリコール酸ソーダをそれぞれ 0.02%，0.1%，0.5%，1％ 添加し，同様高層に固めて流動パラフィンを重層したものである。これらの電位の測定には電気的方法を用いた。培地は殺菌直後，48°C に急冷し，15 cc の培地に 3.0×10^3 になるように各株の芽胞懸濁液を接種して水で急冷凝固させた。後これを 30°C に培養し，生じたコロニーの直径を 10 倍のルーペで，顕微鏡用の接眼ミクロメーターを用いて測定した。Eh +0.23 ボルト以上の条件（平板）は表面直下のコロニーについて，またそれ以下の電位条件（高層）のコロニーは，たとえ流動パラフィンを重層しても先の実験でたしかめたように表面から多少酸素が浸入して電位が上昇するので，培地の中間より深部のコロニーを測定した。いずれも 20 箇前後のコロニーを計り，その平均と標準偏差を求めた。また参考のために偏性嫌気性菌である *Cl. sporogenes* についても同様な実験を行なつた。

いずれの菌株も培地の Eh が低くなるにしたがい，肉眼で認められるまでに生長するのに相当の時間を要する。殊に Eh −0.25 ボルト以下になると，1日目にはほとんどの菌株の生育が認められない。この現象は *Clostridium* といえども同様である。その後徐々に生育するが，4日目以後はほとんど発育せず一定になるようである。Table 4 に3日目の結果を示した。

Table 4. Size of bacterial colony grown in various oxidation-reduction potential of the agar medium after 3 days incubation at 30°C.

Potential of medium (Eh in volts)	Diameter of colony ($\times10^{-1}$ mm)					
	B. subtilis (F)	*B. subtilis* Bact 2–8	*B. cereus* IAM Bact 4–6	*B. cereus* var. *mycoides* No. 5	*B. circulans* NN	*Cl. sporogenes* NCA. PA. 3679
over +0.23	11.6±1.1	6.5±0.5	15.2±1.2	18.1±1.0	3.5±0.4	no growth
−0.04	2.5±0.5	2.0±0.04	4.6±0.6	3.5±0.2	1.8±0.1	4.0±0.4
−0.16	3.4±0.4	2.5±0.3	3.0±0.3	2.5±0.3	2.2±0.2	4.5±0.2
−0.20	2.7±0.4	3.0±0.1	3.7±0.3	3.0±0.1	2.2±0.3	4.0±0.3
−0.25	4.4±0.3	2.0±0.3	2.8±0.2	2.5±0.2	1.8±0.2	2.0±0.1
−0.29	2.3±0.3	2.0±0.2	2.5±0.8	no growth	1.5±0.5	filamentus growth

表から判るように，Eh +0.23 ボルト以上の高い電位における発育は，いずれの菌株も良好であるが，Eh がマイナス側になると発育も微弱になる。しかしマイナス側の電位の間にはあまり大きな差はみられない。ここで問題になるのは *B. circulans* (NN) を除き，他の菌株はいずれも低電位になるにしたがい，コロニーの発生数が減少することである。寒天培地に細菌を培養する際，コロニーの密度が高いと一つ一つのコロニーの大きさは小さくなり，コロニーの密度が低いとコロニーの大きさは大きくなることが知られている[19]。したがつてこの実験では接種菌数は一定であるが，発生コロニーの数がかならずしも一定でないわけであるから，この点を考慮しなければならないと考える。殊に *B. cereus* var. *mycoides* No. 5 は，Eh −0.25 ボルトにおいて Eh +0.23 ボルト以上の場合の約半分のコロニーが発生するに過ぎない。これに反し *B. circulans* (NN) は低電位においてもコロニー数はほとんど変らない。またこの菌株は高電位と低電位のコロニーの大きさにあまり差がなく，寧ろ通性嫌気性菌に近い菌株であると思われる。このような事実

についてはすでに，この菌株の分離された際に多少ふれておつた[16]。また *Cl. sporogenes* の発育が Eh −0.16 ボルトが最高であつて，プラス側の電位では生育しないことは，従来の報告とも一致し，当然であるとしても，Eh −0.25 ボルト以下になると発育が悪くなる事実は意外であつた。このような偏性嫌気性菌にも，嫌気的といわれている条件の中で，生育に適した電位が存在するのではないかと思われる。

考　　察

O-R. P と細菌の繁殖との関係は，嫌気性菌については意見が一致しており，大体 Eh −0.1～0.2 ボルト以下に培地の O-R. P を下げてやると，空気を吹き込んでもよく生長するという[20]。ところが好気性菌と O-R. P との関係についてはかならずしも意見が一致していないようである。例えば KNAYSI[8] によると，普通の培地では酸素の含量と O-R. P とは密接に関連しており，細菌に対する影響はあたかも同一の影響のようであるが，これは分離して研究する必要があると主張し，減圧下すなわち酸素の稀薄な状態では，細菌の生長制限因子は酸素含量であつて O-R. P ではないと述べている。これに対し WOOD[9] は適当な酸素の存在する場合，すなわち普通の培養基では O-R. P が細菌の繁殖を決定する因子であると反論している。

いずれにしろわれわれの取扱うねり製品は，特に減圧にされているわけではないから，酸素含量の変化はただちに O-R. P の変化として表われてくることになる。また KNAYSI の実験結果を吟味してみると，*B. megaterium* は条件のいかんに関係なく，Eh +0.190 ボルト以下の電位で発育が阻止される結果が得られいる。この点に関しては今回の実験結果とよく一致している。

今度の実験で明らかにしたように，一般に好気性菌といわれている *Bacillus* 属菌も低電位で繁殖し得る菌株があることは事実である。電位との関係を論ずる際は，この性質の異なる菌株を別けて実験することが必要である。またこのような偏性好気的と通性好気的な性質を示す菌は種 (species) によつてきまつているのではないようであつて，同じ菌種中にも低電位で発育できる菌株とできない菌株がある。このことは *Bacillus* 属の分類において，特に偏性好気性菌と通性好気性菌を分類していない現在では，当然のことであると考える[21]。

偏性好気性 *Bacillus* の芽胞を低電位培地に接種しても発育を示さないのであるが，この際芽胞が発芽しているかどうかは不明である。ROTH[22] は *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. megaterium* を用い，低電位 (Eh −0.3 ボルト) においても通気した場合と同様に，1時間以内に 99% 以上の発芽率を示すことを報告している。しかし最近，木俣，赤松[13] の報告によると *Bacillus* 中には嫌気的条件で影響を受ける菌株も存在するとのことである。

Table 1 に示したように，培地に糖を添加しないと低電位条件で *Bacillus* 菌株はほとんど繁殖しない。これは一般に *Bacillus* 属の低電位における発育に醱酵性の糖が必要であつて，窒素化合物をエネルギー源として利用できないのではないかと思われる。この事実はまた魚肉ソーセージの内部に *Bacillus* 属菌が繁殖しても，揮発性塩基窒素の増大がほとんど認められないことと何等かの関係がありそうである。すなわち *Bacillus* 属菌の窒素化合物分解酵素が比較的高い電位を必要とするためと思われる。

摘　　要

1) 多数の *Bacillus* 属菌を集め，これらの発育に対する培地の初期電位の影響を固体培地を用いて実験した。

2) ブドー糖寒天培地を用いた場合，Eh −0.2 ボルトの低電位条件に生育し得ない菌は供試菌 21 株中 11 株であつて，*B. megaterium* は4株全部生育が認められなかつた。この結果は培地に酵母エキスを加えても変りない。

3) 培地から糖を除くと，大部分の菌株は低電位において生育できなくなる。これに澱粉を加えると，大部分の菌は糖を加えた場合と同様の発育を示す。

4) 低電位条件で発育できない菌株の発育下限 Eh はブドー糖寒天培地を用いた場合，芽胞も栄養菌体も

ほぼ同じで Eh +0.20 ボルト附近であつた。これに対し糖を加えない培地では Eh +0.24 ボルト以上であつた。

5) 通性好気性 *Bacillus* の発育に対する電位の影響は，Eh +0.23 ボルト以上の高電位においての繁殖はきわめて良好であるが，培地の電位がマイナス側になると発育はきわめて悪くなる。菌株によつては −0.25 ボルト以下に電位が下ると発育できなくなる。一般に電位が低くなると発生コロニー数が減少する傾向がみられる。

終りに種々御懇切な御指導をいただいた天野慶之博士に厚く感謝の意を表する。

文　　献

1) 横関源延：本誌，**24**，765～769 (1959)，
2) P. FILDES: *Brit. J. Exp. Path.*, **10**, 151～175 (1929).
3) B.C.J.G. KNIGHT and P. FILDES: *Biochem. J.*, **24**, 1496～1502 (1930).
4) B. VENNESLAND and M.E. HANKE: *J. Bact.*, **39**, 139～169 (1940).
5) G.B. REED and J.H. ORRr *J. Bact.*, **45**, 309～320 (1943).
6) A.I. LASKIN and O.B. WILLIAMS: *Bacteriol. Proceedings*, pp. 41 (1955).
7) C.H. WERKMAN and P.W. WILSON: "Bacterial Physiology", pp. 152～156 (1951).
8) G. KNAYSI and S.R. DUTKY: *J. Bact.*, **27**, 109～119 (1934).
9) W.B. WOOD, JR., M.L. WOOD and I.L. BALDWIN: *J. Bact.*, **30**, 593～602 (1935).
10) C.E. COHN-BRONNER: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **45**, 454～456 (1940).
11) G. CHARLTON: *J. Bact.*, **70**, 56～59 (1955).
12) 横関源延：本誌，**23**，539～542 (1958).
13) 木俣正夫・赤松幹夫：1959 年度日本水産学会年会講演（東京）.
14) 内山　均・天野慶之：1959 年度日本水産学会年会講演（東京）.
15) 横関源延：本誌，**23**，543～546 (1958).
16) 横関源延・内山　均・馬見塚利明：本誌，**24**，156～160 (1958).
17) 天羽幹夫・坂口謹一郎：農化誌，**26**，353～359 (1952).
18) R.T. O'BRIEN and L.L. CAMPBELL, JR.: *J. Bact.*, **73**, 522～524 (1957).
19) 中山大樹・多田靖次：農化誌，**33**，133～137 (1959).
20) I.J. KLIGER and K, GUGGENHEIM: *J. Bact.*, **35**, 141～156 (1937).
21) R.S. BREED, E.G.D. MURRAY and N.R. SMITH: "BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology", 7 th ed. (1957).
22) N.G. ROTH and D.H. LIVELY: *J. Bact.*, **71**, 162～166 (1956).

魚肉ソーセージの軟化現象について—V.

軟化原因細菌 *Bacillus circulans* の芽胞生育におよぼすピロ燐酸ソーダおよびソルビン酸の影響

内山 均・天野慶之

(1959 年 6 月 19 日受理)

THE SOFTENING SPOILAGE OF FISH SAUSAGE—V. EFFECT OF SODIUM PYROPHOSPHATE AND SORBIC ACID ON THE GROWTH OF SPORE OF *BACILLUS CIRCULANS*.

Hitoshi Uchiyama and Keishi Amano*

In the previous papers[1,2,3], characteristics of the softening spoilage of fish sausage, species of causative bacteria with reference to its activity of decomposing starch under anaerobic condition have been reported. In addition, the use[4] of a mixture of three different compounds, including sodium pyrophosphate, sorbic aicd and glucose was suggested to be effective as a preventive means of this particular spoilage.

This time, the nature of sodium pyrophosphate relevant to the retardation of growth in the spoilage bacteria will be discussed.

W. Vishniac (1950)[18], and separately G. Dirheimer (1956)[19], already pointed out an inhibitory effect of pyrophosphate or tripolyphosphate on yeast hexokinase. They noticed that some chelating action of these polyphosphates with magnesium ion would cause the inhibition of hexokinase, which then can be restored by addition of $MgSO_4$ or adenosinetriphosphate.

Halvorson (1957)[5] stated that certain bacterial spores will be able to make process of glucose metabolism without E.M.P. glycolytic cycle. After the germination take plack, however, phosphorylation reatcion[22] should be necessary for normal growth and propagation of their vegetative cells. It is probably valid from Treadwell's experiment (1958), in which he added one of the following sodium azide, monoiodoacetic acid and dinitrophenol to the spore culture and found a marked retardation in growth phase of vegetative cells after the germination had completed.

A similar line of the research is just our primary concern about *Bacillus circulans* how the different stage of its growth is really inhibited by the presence of sodium pyrophosphate and sorbic acid.

By a test for the culture of *Bacillus circulans* in a medium containing pepton, glucose, sodium chloride, and sodium pyrophosphate (0.4 per cent), it showed a more restricted consumption of glucose accompanied by a samll change in pH value throughout the cultivation than the culture in which the polyphosphate was entirely absent.

A nepherometric observation was carried out of the whole progress of growth, covering germination, outgrowth and cell division of the microorganism, with a culture medium, to which L-alanine (6 mM), adenosine (12 μM), sodium pyrophosphate (0.4%) and sorbic acid (0.1%) were incorporated. As shown in Fig. 3 and 4, the pyrophosphate not looks like to affect on germination but on the growth phase afterward. Also it is clear in a series of photomicrograph of Plate 1, vegetative cells in chain form can scarcely be seen even after 24 hours' incubation, while in a control run, many rod-shaped forms in chain are found in a sample of 9 and 24

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab, Chuō-ku, Tokyo, Japan).

東海区水産研究所業績 B 第 321 号

hours'. The presence of sodium azide or monoindoacetic acid can give a similar pattern of growth (Plate 2 and 3). Also electronmicrographs from Plate 5, 6 and 7 would show a more detailed picture of each growth phase. In the culture containing sodium pyrophosphate, certain number of spore indicate translucent area in spore and others are partly broken after a few hour's cultivation and small number of vegetative form only develops in 24 hours' culture.

From the foregoing findings, sodium pyrophosphate and sorbic acid seem to play a main part of inhibition on both growth phase and cell division rather than on germination of the spores of *Bacillus circulans*.

前報[1),2),3)]で，魚肉ソーセージの軟化現象の特徴および原因細菌等について述べ，この防止には，ピロ燐酸ソーダならびにソルビン酸を glucose とともに摺身に加えることによつて，防止できることを報告[4)]した。

このような添加物が，軟化防止に効果あるのは，加燐酸分解による，糖の代謝機構と何らかの関係があろう。すなわち，芽胞から発育型細胞が形成される際に，これらの添加物が存在すると，母細胞への生育が抑制されるばかりでなく，母細胞自身の分裂も阻害されるのではなかろうかと推察した。なぜなら，HALVORSON*[5)]等は，細菌芽胞の場合，いわゆる E. M. glycolytic cycle を経ずして，グルコースの代謝が行われるとしているけれども，発芽以後の生育には，加燐酸分解**の反応を否定することはできないと考えられるからである。

今回は，軟化原因細菌，*B. circulans* の芽胞を用い，上述の添加物の存在下における，芽胞の発芽およびその後の生育状態を検討し，併せて，形態学的変化を光学顕微鏡および電子顕微鏡によつて観察したので，その結果を報告する。

実 験 方 法

1. ピロ燐酸ソーダ添加培地による *B. circulans* の培養

肉エキス，pepton，食塩を含む液体培地に，glucose を 0.5% になるように加え，同時にピロ燐酸ソーダを 0.4% に加えて 115°C, 10 分加熱殺菌して用いた。対照には，ピロ燐酸ソーダを加えないものを用い，両者に，*B. circulans* の芽胞懸濁液を一定量加えて，glucose の消費および pH の変化をみた。glucose は HANS 法により，pH は BECKMAN model G の測定器によつた。

2. 芽胞懸濁液の調製

細菌芽胞を高収率に得ることは，菌種によつてはかなり困難である。従来から，いろいろの方法が考慮されているが，一般に Mn イオン[7)]の存在は，sporulation を良好にするとされているので，$MnSO_4$ を培地に加えて，*B. circulans* を培養した。すなわち，普通寒天培地に 0.08% になるように $MnSO_4$ を加え，滅菌後，大形ペトリ皿に流し，固定後，無菌箱の中で，4~5*** 日培養の *B. circulans* を表面に均一に接種し，30°C に 10 日間培養して芽胞の形成を促した。つぎに，これを殺菌したスパチュラで掻きとり，殺菌燐酸緩衝液 (pH 7.0~7.2) に懸濁させ，綿栓**** を有する無菌遠心沈澱管にいれて，遠心し洗滌する。芽胞は，3000 回転 30 分にして大部分が沈澱してくる。上澄液を捨て，再び殺菌緩衝液を加えて，80°C, 20 分加熱して残存する発育型細胞を殺菌する。以後この洗滌操作を検鏡によつて，発育型細胞のみえなくなるまでくりかえした (10 回以上)。洗滌の終つた芽胞懸濁液は，凍結保存し必要に応じて生理的食塩水でうすめて用いた。

---

* HALVORSON は，E.M.P. cycle の代りに hexose monophosphate pathway を想定している。しかし，天羽氏は菌株によつては，E.M.P. cycle を否定することはできないとしている。

** NaF, HCN, dinitrophenol[17),22)] 等によつて，芽胞の発芽後の生育が阻害されるのは，その一つの証左であろう。

*** *B. circulans* のコロニーは，この程度の培養でないと形成されない。

**** 遠心中，綿栓が脱落しないように，上部に細いくれびをつけた沈澱管を試作した。

3. 発芽およびそれ以後の生育観察に用いた培地

芽胞が発芽する際の栄養要求[8),9),10)]については，多くの報告がなされているが，中でも，L-alanine および adenosine は，好気性芽胞形成菌の芽胞に対して，発芽促進作用のあることが広く知られている。そこで，軟化原因細菌，*B. circulans* の発芽およびそれ以後の生育の観察にも，L-alanine および adenosine を添加した培地を用いた。

pepton (1%)，肉エキス (1%)，glucose (0.5%)，食塩 (1%) を含む培地に，L-alanine を 6mM に，adenosine を 12μM になるように加え，ピロ燐酸ソーダを加えるものは，前回同様，0.4% になるように加えた。そして，さらに魚肉ソーセージに添加が許されている，ソルビン酸を 0.1 % 添加して，115°C, 10 分加熱殺菌して用いた。

これに，前述した芽胞の懸濁液を，生理的食塩水で稀釈し，80°C, 20 分加熱し冷後，一定量を培地に加え，37°C で発芽およびそれ以後の生育過程を観察した。

なお，発芽後の芽胞生育抑制剤の一種である，NaN_3 を 2×10^{-3} M 濃度に，monoiodoacetic acid を 2.4×10^{-4} M 濃度に同様の培地に加え，燐酸塩添加区のものと比較して，発芽およびそれ以後の生育への影響を観察した。

4. 発芽および発育型細胞形成過程の観察法

芽胞の発芽の判定は，耐熱性の消失および非染色性[11),12)]の有無等の判定によつて行われているが，outgrowth およびこれが発育型細胞まで生育していく過程を，連続的に観察するには，芽胞懸濁液の透過率を測定していくのが便利である。

HACHISUKA[13)] および MANDELS[14)] が指摘しているように，芽胞は発芽に際し，まず芽胞自身が透明となり，耐熱性と非染色性を失う。この過程までを発芽と見なせば，発芽はそれが含まれる培地の透過率の低下を測定することで判断できる。発芽した芽胞はひき続いて膨化し，体積を増大していく。したがつて，一度低下した透過率は再び増大し，かつ発育型細胞の分裂とともに著しく増大することになる。

透過率の測定には，実験の一部では COLEMAN 光電比色計を用い，一部では日立製分光光電光度計を用いた。波長は両者とも，610 mμ である。芽胞を植えつけた，L-alanine 添加培地そのものを，氷中に保持し，発芽を阻止して常に標準液とし，37°C で培養したものと比較した。

5. 芽胞および発育型細胞数の測定

前述した培地より白金耳で試料をとり，これを TOHMA の血球計算室に流し，常法[15)] にしたがつて一室中の芽胞数および発育型細胞数を観察した。この目的は，NaN_3 あるいは monoiodoacetic acid を添加したもの，さらにピロ燐酸ソーダ等を加えたものは，対照区に比べて，発育型細胞への生育が顕著に抑えられるから，その割合を比較検討するためである。観察は位相差顕微鏡を用いて，暗視野で観察するのが容易である。

以上の観察と平行して，時間ごとに変化する芽胞形態の写真撮影をおこなつた。培地を含んだ菌体を塗抹して標本を作ると，培地中の食塩が析出し，観察が困難となり，また，析出した結晶を再び溶解してから観察しようとすると，菌体が僅かに流動するので，長時間の露出では明確な写像が得られない（特に位相差顕微鏡による場合は，視野が暗いため，撮影には長時間の露出を必要とする)。

そこで，一時間おきに採集した培養液を，遠心分離して，殺菌蒸溜水で洗い，再び蒸溜水を加えて，これを塗抹固定し，APATHY[16)] のゴムシラップ*中に包理して撮影した。

6. 電子顕微鏡による芽胞および発育型細胞の観察

実験 5 で述べた試料のうち，培養前の休眠芽胞と，6 時間および 24 時間培養の対照区と燐酸塩添加区とを選んだ。各懸濁液は，蒸溜水で数回洗滌し，これを直ちに sheat mesh に滴下，自然乾燥させてから，50 キロボルト加速電圧で観察し撮影した。電子顕微鏡は明石製作所 TRS-50 E 1 を用いた。

* 包埋の際，シラップに濃淡ができるので，標本に波紋状の像ができ，鮮明な写像ができにくかつた。

実 験 結 果

1. *B. circulans* の glucose 代謝におよぼすピロ燐酸ソーダの影響

前述した glucose 培地に 0.4% のピロ燐酸ソーダを加え，*B. circulans* の芽胞を約 10^4/ml 程度に植えつけた。30°C に放置して，glucose の消費を測定したところ，Fig. 1 に示すような結果が得られた。燐酸塩を加えた場合は，明かに glucose の代謝抑制がみられる。このような実験は，再三くりかえしたが，同じような結果が得られた。

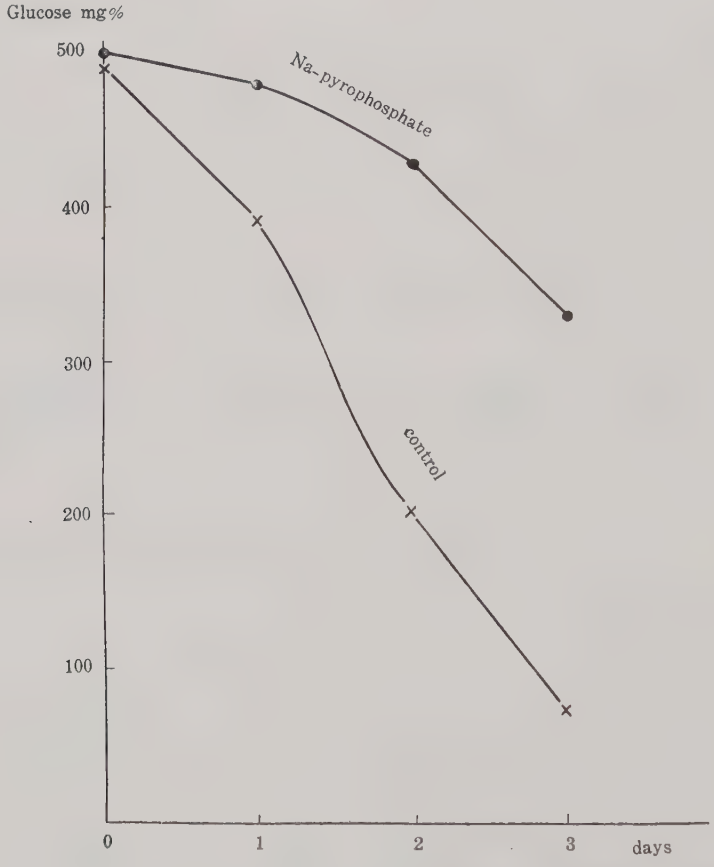


Fig. 1. Effect of sodium pyrophosphate on glucose metabolism of spores of *B. circulans*. (30°C.)

Fig. 2 は，同じ実験の pH の変化である。glucose の消失と一致した結果が得られ，燐酸塩を加えたものは，培地の pH が低下しにくい傾向がある。

2. *B. circulans* の芽胞の発芽およびそれに続く生育段階におよぼすピロ燐酸ソーダおよびソルビン酸の影響

前述した方法で，L-alanine, adenosine 等を加えた培地に，*B. circulans* の芽胞を約 10^4/ml 程度に加え，37°C に放置して，時間とともに変化する培地の透過率を測定した結果は，Fig. 3 に示すごとくである。

透過率は，実験開始後，約1時間までに低下し，芽胞が発芽していることを示す。NaN_3 を加えた場合は2時間近く要し，発芽が多少抑制されていることが判る。ところが，対照区および燐酸塩添加区は，ほとん

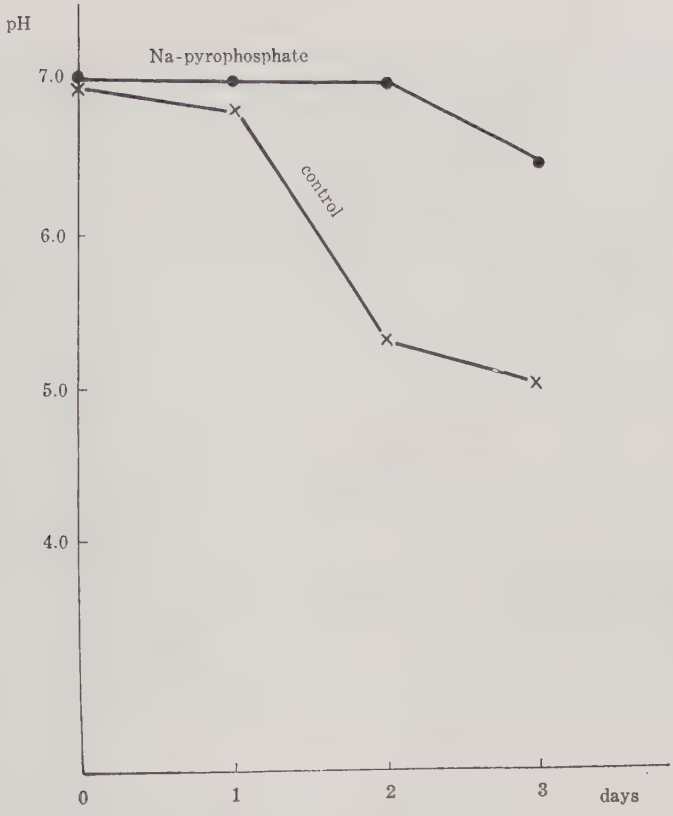


Fig. 2. Effect of sodium pyrophosphate on glucose metabolism of spores of *B. circulans*. (30°C.)

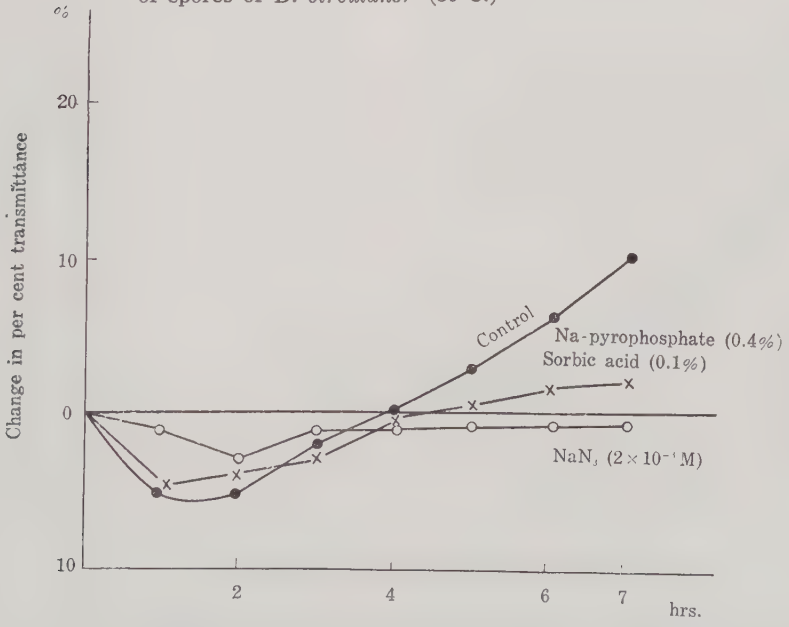


Fig. 3. Change in per cent transmittance of a thick suspension of spores of *B. circulans*.

Table 1. Effect of sodium pyrophosphate and sorbic acid on the formation of vegetative cell developed from spore of *B. circurans*.

	Control			Na-pyrophosphate +sorbic acid		
	Total number	Number of rods	Rod / Total ×100	Total number	Number of rods	Rod / Total ×100
1	37	11	29.7	28	1	3.5
2	44	10	22.7	38	2	5.2
3	49	11	22.4	39	0	0
4	46	14	30.4	50	0	0
5	52	20	38.4	26	2	7.6
6	48	10	20.8	46	0	0
7	46	12	26.0	48	0	0
8	52	8	15.3	56	0	0
9	54	10	18.5	51	1	1.9
10	56	8	14.2	54	4	7.4

Bacterial counts were carried out with TOHMA's haemocyometer.

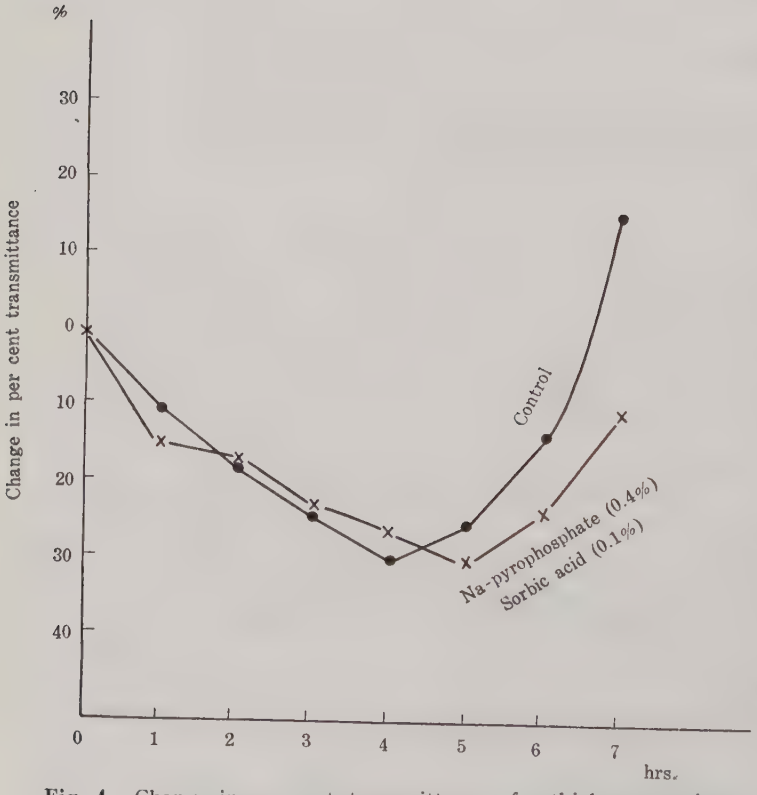


Fig. 4. Change in per cent transmittance of a thick suspension of spores of *B. circulans*.

ど同一の低下曲線をたどる。このことは，燐酸塩その他の添加物が，芽胞の発芽には影響していないと考えられる。けれども，発芽以後の透過率は，対照区に比較して，燐酸塩添加区は上昇しにくいから，抑制は発芽後の生育に関係しているのであろう。さらに，NaN_3 を添加した場合は，この傾向が著しい。NaN_3 添加区を，位相差顕微鏡で観察したところでは，芽胞から生育した連鎖状の桿状菌が全くみられなかつた。

つぎに，対照区と燐酸塩添加区との，全菌数に対する桿状の発育型細胞数との割合を検鏡によつて比較してみると，Table 1 のごとき値が得られた。すなわち，7時間では，燐酸塩添加区の場合，桿状の発育形細胞数が全菌数に比較して少なく，その全菌数に対する比率は，0～7.6% の範囲にあるのに反して，対照区は 14～38% の範囲にある。

以上の実験により，燐酸塩添加区は，芽胞の発芽以後の生育を抑制すると推定される訳であるが，さらに芽胞の濃度を変え，また，正確を期するために，分光光電光度計（日立製 EPU 2 型）を用いて実験をくりかえした。

実験方法は，前述の方法と全く同様におこなつたが芽胞は約 10^6/ml 程度に加えた，

Fig. 4 に示すごとく，対照区および燐酸塩添加区の低下は，ほとんど同様の曲線を示し，以後，燐酸塩添加区が上昇しにくいことが判る。この点から推定しても，燐酸塩添加区の抑制作

用は，発芽後の生育に関係があるとみてよかろう。

3. *B. circulans* の芽胞をピロ燐酸ソーダおよびソルビン酸で処理した場合の形態的変化の観察

図版1は，前述の実験と同様の培地に，*B. circulans* 芽胞を植えつけて，対照区および燐酸塩添加区中に存在する芽胞が，どのような形態的変化を示すかを観察したものである。試料は1時間おきに採集して撮影したが，ここでは，6，9，24 時間の観察結果を示すことにする。

S は，芽胞懸濁液中の休眠芽胞である。これを各々の培地に加え，37°C に放置した。対照区では，6時間ですでに桿状の発育型細胞の形成がみられる。9時間では，発育型細胞が連鎖状に結合し無数に形成されているのが認められる。連鎖の状態（対照区 10 時間）を，拡大してみると，図版4のごとき様相をしている。これに反して，燐酸塩添加区は，連鎖状の発育型細胞が全く認められない。培地に NaN_3 あるいは monoiodoacetic acid を加えた場合の観察は，図版2および3に示す。両者とも，燐酸塩添加区*と同様に連鎖状の発育型細胞の形成がみられなかつた。

4. 電子顕微鏡による *B. circulans* の芽胞生育過程の観察

光学顕微鏡による，上述の観察に追加して，電子顕微鏡の観察結果を，図版 5，6，7 に示す。

試料は前述の培養前の休眠芽胞および，6時間と 24 時間培養の対照区と燐酸塩添加区である。

休眠芽胞には全く透明な部分がみられない。しかし芽胞に接して capsule 状** のものがみられる。対照の6時間培養では，すでに芽胞から桿菌の形成が認められ，24 時間培養では，発育型細胞が連鎖するまでに生育しているのが判る。燐酸塩添加区の6時間では，桿状の発育型細胞はみられないけれども，一部の芽胞には透明な部分あるいは，すでに崩壊した部分がみられる。このような形態を示すものは，耐熱性を消失したものとみなし得る。また 24 時間では，桿状の発育型細胞がみられるようになるが，その比率は対照区に比べてはるかに少ない。

以上から，燐酸塩およびソルビン酸の作用は，発芽以後の生育に関係していることは勿論であるが，発育型細胞の形成，生育，分裂の諸段階にも抑制を示すものと考えられる。

考　　察

TREADWELL[17]は，*Clostridium botulinum* を用い，芽胞の発芽と outgrowth およびこれが母細胞まで生育していく過程について興味ある実験をしている。すなわち，本細菌芽胞に，NaN_3, fluoride, monoiodoacetic acid, dinitrophenol 等の酵素阻害剤，あるいは subtilin, penicillin, streptomycin のごとき抗生物質を加えた場合，発芽は完全に抑制されないが，outgrowth の段階では，NaN_3 および fluoride 以外の化合物は阻害作用を示す。また NaN_3 および fluoride は，発育型細胞自身の生長および分裂を阻害するとしている。

軟化原因細菌，*B. circulans* の芽胞の場合も，NaN_3 の添加によつて，発芽が対照区に比べて，やや抑制されるが，完全には阻止し得ないことが判る。しかし，発芽後の培地の透過率は上昇せず，連鎖状の発育型細胞の形成は，24 時間培養でも認められなかつた。monoiodoacetic acid を加えた場合の形態も，NaN_3 を加えたものと同じ傾向である（図版3）。燐酸塩添加区の芽胞も，NaN_3 を加えたものと同様な透過率を示し，これらの添加物が，発育型細胞の形成，生育，さらにまた分裂にも抑制を示しているといえよう。

加うるに電子顕微鏡による形態的変化の観察も，よく透過率の測定結果と一致している。すなわち，燐酸塩添加区の 24 時間培養（図版7）では，顕著ではないが，単一の発育型細胞の形成がみられるのである。このことは，燐酸塩およびソルビン酸が，芽胞の発芽抑制に大した関係がなく，それ以後の生育，分裂を抑制するとみられるが，さらに長時間培養について検討したい。

HACHISUKA[13]は，*B. subtilis* (PCI 219) の芽胞の発芽過程を電子顕微鏡観察している。そして発芽の

---

* 後述するごとく，電子顕微鏡による観察では，単細胞の発育型細胞が形成されていることが判る。

** 母細胞の細胞膜残滓と考えられる。洗滌により除去されやすいものと，されにくいものとある。天羽氏による。

初期には，芽胞細胞に透明な部分が形成され，耐熱性が失われ，ついで崩壊がおこり新しい発育型細胞の形成をみるとしている。*B. circulans* の場合も，図版 5，6，7 に示すごとく，同様な過程を経て母細胞になることが認められた。

ピロ燐酸ソーダの芽胞生育に対する抑制作用機構が何かは，今後の最も重要な課題であるが，VISHNIAC[18] の報告した *Saccharomyces cerevisiae* hexokinase のトリポリ燐酸による阻害などは一つの見解といえる。彼は，hexokinase の co-factor である Mg が，トリポリ燐酸でキレートされるためとして，トリポリ燐酸の阻害作用を，ATP あるいは $MgSO_4$ の添加で回復させることを知つた。同様の結果を，DIRHEIMER[19] も確認しており，直鎖の縮合燐酸塩は阻害作用があるが，トリメタ燐酸のような環状構造を有するものは，濃度を高めても，阻害を示さないという。

ピロ燐酸ソーダとともに，ソルビン酸を加えたのは，たまたま魚肉ソーセージに添加が許可されている事情を考慮したためだがピロ燐酸ソーダとの協同作用には，疑問がある。

最近，今井[20]および岡[21]は，食品防腐剤の作用機構を検討し，ソルビン酸，デハイドロ酢酸，サルチル酸のような酸性抗菌剤の効果は，分子の非解離性部分が，菌体に吸着されることによるとし，そして，解離分子は，吸着されにくいことをみとめ，菌体の荷電が吸着を阻むと説明している。

この意見をとり入れると，われわれの実験では，酸性領域でソルビン酸を用いていないから，ソルビン酸による芽胞生育の抑制は小さいものと想像される。これらについては，ピロ燐酸ソーダのキレーションの知見と併せて検討中である。

いずれにしても，縮合燐酸塩は，いわゆる食品防腐剤ではないが，こうした特質を利用して，より毒性の少ない，しかも貯蔵性のある食品を工夫改良していくことが，これから著者らの注目しているところである。

要　　約

1) 魚肉ソーセージにピロ燐酸ソーダおよびソルビン酸を glucose とともに加えると，軟化変敗を防ぐことができる。そこで，これらの添加物が，芽胞生育のどの段階に抑制作用を示すかを検討した。

2) 軟化原因細胞，*B. circulans* の芽胞を glucose を含む培地で培養した場合，ピロ燐酸ソーダを加えると，glucose の代謝が抑制される。

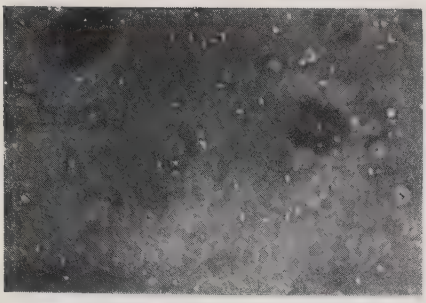
3) *Bacillus* 属の芽胞発芽促進物質として知られている。L-alanine, adenosine, glucose を加えた培地に *B. circulans* の芽胞を加えて，発芽およびそれ以後の生育を，培地の透過率を測定して観察してみると，ピロ燐酸ソーダおよびソルビン酸を加えたもの，また NaN_3 を加えたものは，発育型細胞の生育が抑制されていることが判る。

4) ピロ燐酸ソーダおよびソルビン酸添加区の抑制作用は，芽胞の発芽そのものには影響をおよぼさない。なぜなら，これらの添加物を加えた場合も，無添加の場合も，透過率に顕著な相違がない。

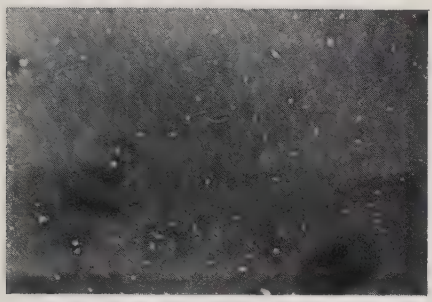
5) 電子顕微鏡によつて，芽胞生育の過程を観察してみると，ピロ燐酸ソーダおよびソルビン酸添加区は，連鎖状に結合した，発育型細胞がみられない。しかし，芽胞細胞に透明な部分が形成されたり，崩壊したものも現われる。これらは耐熱性を失つた芽胞である。このことは，ピロ燐酸ソーダおよびソルビン酸の抑制作用は，発芽以後の生育抑制であるということができる。しかも，その抑制は，発育型細胞の形成および，これが分裂する両段階におよぶと考えられる。

終りに臨み，各種の文献をはじめ，何かと御指示を得た，東京大学，天羽幹夫博士に厚く御礼申し上げ，実験に助力された沖野秀高氏，また，顕微鏡写真の撮影に協力された，田中武夫氏に感謝する。

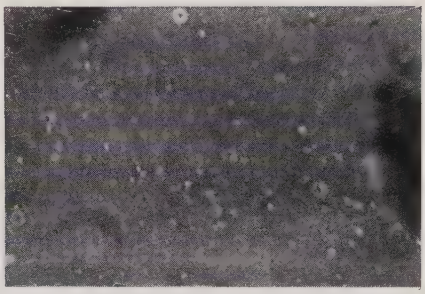
電子顕微鏡観察および，その撮影は，明石製作所，栃木弘，白井恵美子氏等にお世話いただいた。併せて感謝の意をあらわす。



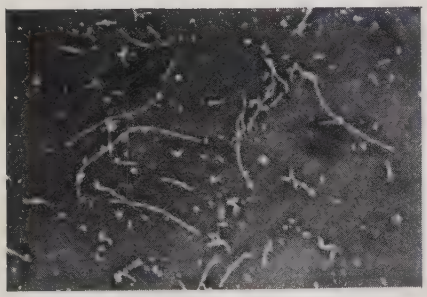
Dormant spores (s)



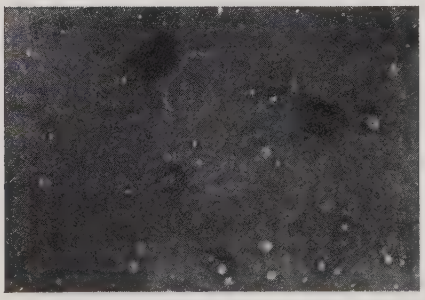
6 hrs



6 hrs



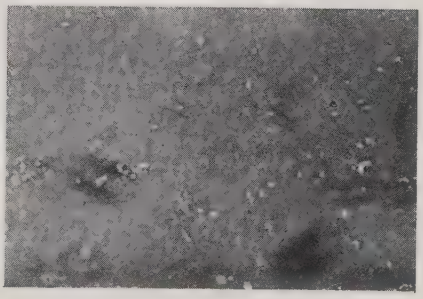
9 hrs



9 hrs

24 hrs

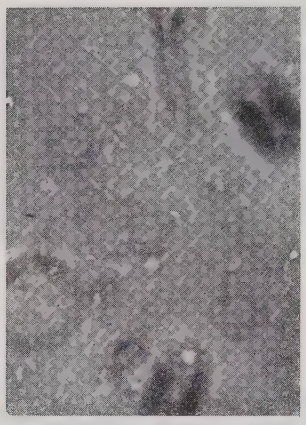
Control



24 hrs

Sodium pyrophosphate (0.4 %)
Sorbic acid (0.1 %)

Plate 1. Effect of sodium pyrophosphate and sorbic acid on the formation of vegetative cells developed from spores of *B. circulans*. (×225).



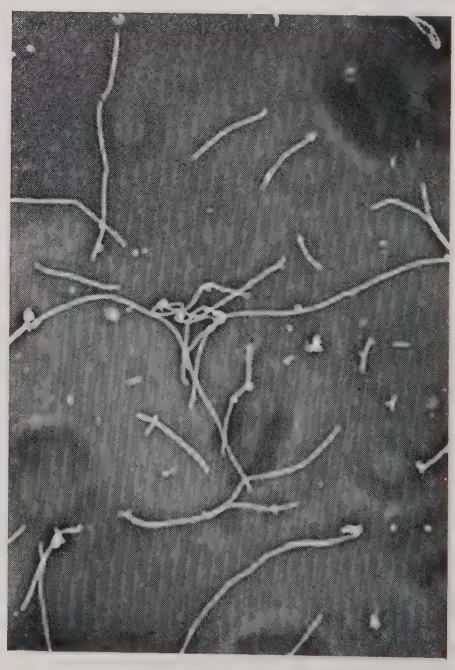
24 hrs (×225)

Plate 2. Spore suspension added by sodium azide (2×10^{-3} M)

24 hrs (×225)

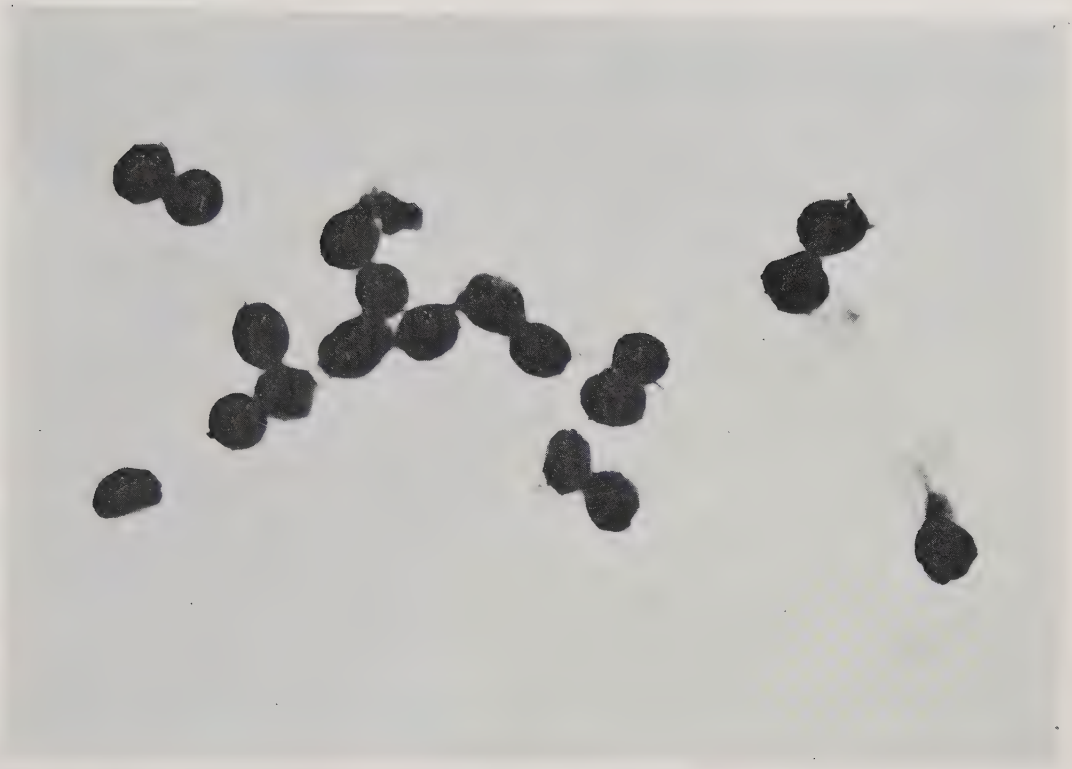
Plate 3. Spore suspension added by monoiodoacetic acid (2.4×10^{-4} M)

10 hrs (×1800)

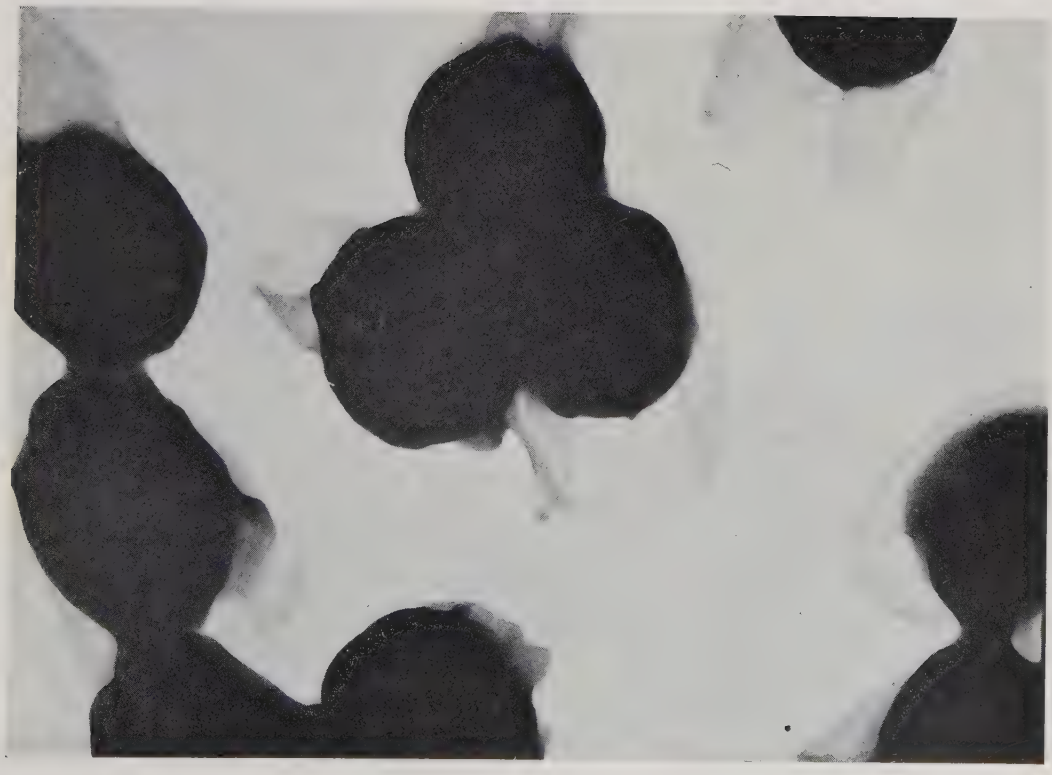


10 hrs (×380)

Plate 4. Microscopic observation of vegetative cells of *B. circulans*.

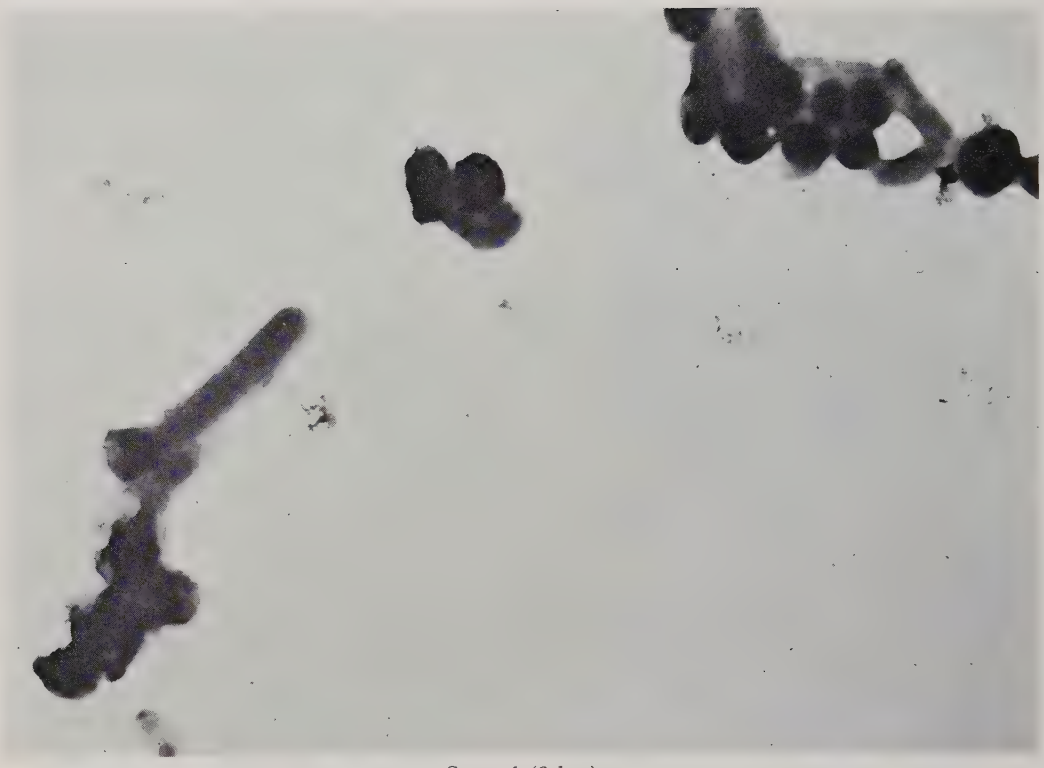


(×10000)

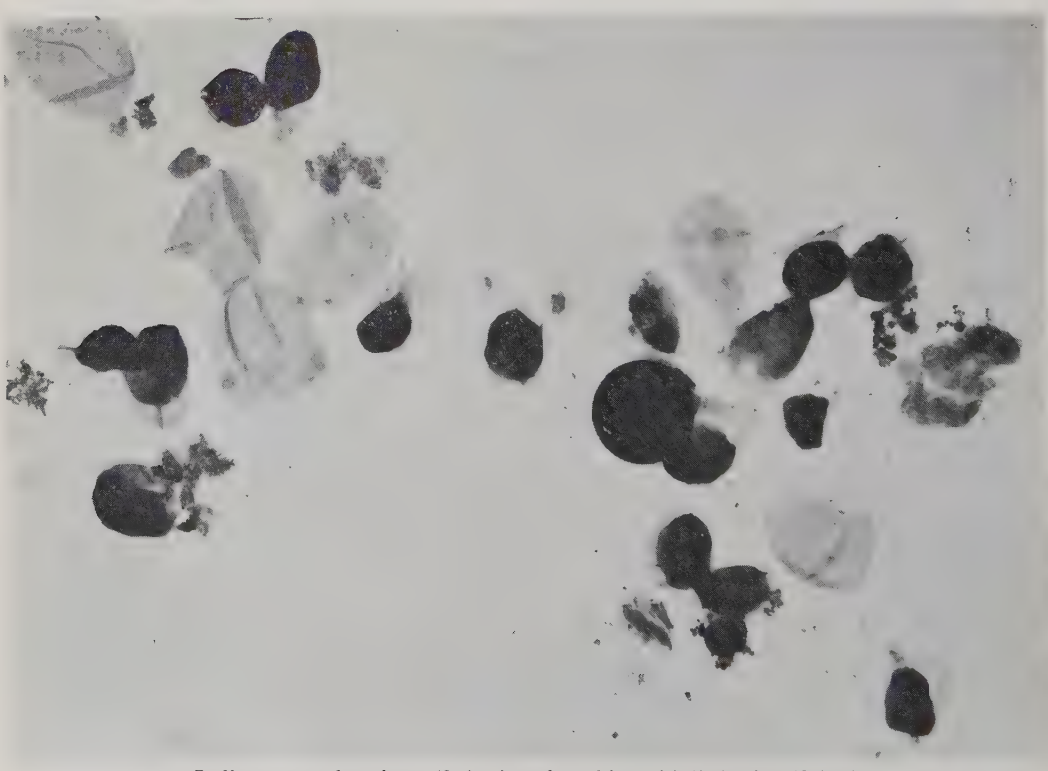


(×30000)

Plate 5. Electron microscopic observation of dormant spores of *B. circulans*.

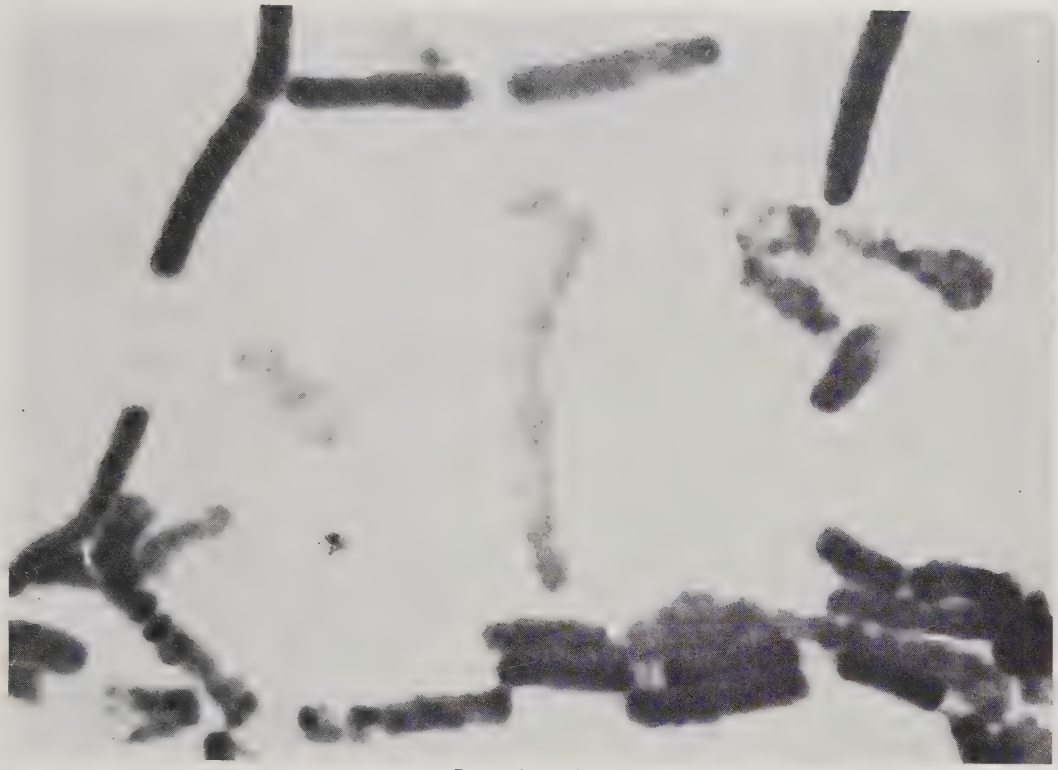


Control (6 hrs)



Sodium pyrophosphate (0.4 %) and sorbic acid (0.1 %). (6 hrs)

Plate 6. Electron microscopic observation of spore germination and vegetative cell formation of *B. circulans*. (×1000).



Control (24 hrs)

Sodium pyrophosphate (0.4 %) and sorbic acid (0.1). (24 hrs)

Plate 7. Electron microscopic observation of spore germination and vegetative cell formation of *B. circulans*. (×10000).

参 考 文 献

1) 内山　均・田中武夫：本誌，**24**，pp. 148～155 (1958).
2) 横関源延・内山　均：本誌，**24**，pp. 156～160 (1958).
3) 内山　均・横関源延：本誌，**24**，pp. 370～377 (1958).
4) 内山　均・天野慶之：東海区水産研究所報告，投稿中 (1959).
5) H.O. HALVORSON: Bacteriological Reviews, **21**, 112～131 (1957).
6) 天羽幹夫：日本農芸化学シンポジウム要録 (1958).
7) D.O. HITZMAN: Journal of Bacteriology, **74**, 1～7 (1957).
8) G.M. HILLS: Biochemical Journal, **45**, 353～362 (1949).
9) G.M. HILLS: Journal of General Microbiology, **4**, 38～47 (1950).
10) W.K. HARREL: Journal of Bacteriology, **69**, 275～279 (1955).
11) J.E. POWELL: Journal of General Microbiology, **5**, 993～1000 (1951).
12) L.L. CAMPBELL: "Bacterial Spore Germination–Definitions and Methods of Study" in H.O. HALVORSON (ed) "Spores" (1957) pp. 33～44 (American Institute of Biological Sciences Washington, D.C.)
13) Y. HACHISUKA: Journal of Bacteriology, **69**, 339～406 (1955).
14) G.R. MANDELS: Journal of General Physiology, **39**, 301～309 (1956).
15) M. AMAHA: Journal of General and Apllied Microbiology, **3**, 169～192 (1957).
16) 緒方知三郎："病理組織顕微鏡標本の作り方手ほどき" 1版，南山堂，東京. (1954), pp. 133～134.
17) P.E. TREADWELL: Journal of Bacteriology, **76**, 544～556 (1958).
18) W. VISHNIAC: Achaive Biochemistry, **26**, 167～172 (1950).
19) G. DIRHEIMER: Bulletin de la Societe De Chimie Biologique **38**, 1337～1353 (1956).
20) 今井　寛：農産加工技術研究会，第6回大会シンポジウム，食品添加物，pp. 30～36 (1959).
21) 岡　　智：醗酵工学雑誌，**36**，502～504 (1959).
22) Y. HACHISUKA and N. ASANO: Science, **124**, 174～175 (1956).

ねり製品の足に対する澱粉の補強効果—Ⅲ.
合成樹脂粒子によるモデル実験

岡 田 稔・山 崎 惇 子

(1959 年 6 月 12 日受理)

ENHANCING EFFECT OF STARCH ON JELLY STRENGTH OF FISH MEAT JELLY—III. MODEL EXPERIMENTS WITH SYNTHETIC RESIN PARTICLES

Minoru Okada and Atsuko Yamazaki*

In the previous papers of this series, it was shown that gelatinization of starch was necessary for enhancing jelly strength of fish meat jelly (Kamaboko), and it was supposed that physical properties of starch granules embeded in meat texture might have a close relationship with its ability reinforcing jelly strength.

In this paper, it was discussed, using synthetic resin particles as models of starch grain, how jelly strength of fish meat jelly varies with the properties (mainly, mechanical strength and affinity for water) of fine particles embeded in the jelly.

In the presence of small particles (diameter of about 100 μ) of polyvinyl chloride (PVC), polyvinilidene chloride (PVdC) or sand, a distinct increase in jelly strength was observed by a gelometer. This effect decreased in the order named.

The effectiveness varied also with size of particles. For example, with PVC, the following order was observed,

$$20\mu > 100\mu > 3\mu.$$

Hydrophobic synthetic resin particles above mentioned had no improving action for "Ashi" of Kamaboko judged by sensory test, though they distinctly increased the mechanical strength of the jelly. On the other hand, granules of polyvinyl alcohol which has a strong affinity for water showed improving effect similar to starch, keeping together meat tissue and water, and creating fine-grained, tender body with high jelly strength.

In conclusion, in order to improve "Ashi" of Kamaboko, it is necessary that granules both with certain degree of mechanical strength and with a strong affinity for water was present in meat texture.

澱粉がねり製品の足に対して補強効果を現わすためには澱粉粒として肉中に混和され，その状態で糊化されることが必要であり，しかも予め糊化せしめた澱粉を加えた場合には，補強効果を示さず逆に弾力のあるゼリーの形成を阻害することを前報[1),2)]において明らかにした。糊化した澱粉粒と生澱粉粒との著るしい違いの1つは水和しているか否かであり，また粒の物理的性質の相違である。すなわち糊化すれば澱粉粒は多量の水を固定して水和性を著るしく増し，また弾力にとんだものとなる。そこで肉中に存在する粒の物理的性質および水和性の有無がねり製品の足にどのような影響を与えるかをみるため，親水性はないが機械的強度の強い物質として澱粉粒とほぼ同じ大きさの海砂，塩化ビニール，塩化ビリデン，および親水性のあるものとしてポリビニールアルコールの小粒子を魚肉のすり身に加えてねり製品の足におよぼす影響をみた。

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab. Chuō-ku, Tokyo, Japan).

東海区水産研究所業績 B 第 314 号

実　　験

1. 実験材料

A. 水和性の無い物質

塩化ビニール樹脂 PVC　$CH_2=CHCl$ の重合物，粒径 3μ, 20μ, 100μ の3種の球形粒子を用いた。

塩化ビニリデン樹脂 PVdC　$CH_2=CCl_2$ の重合物，粒径 100μ の球状粒子。

海　砂　精製海砂を 170 メッシュの篩にかけ通過粒子を選んだ。粒径 80μ の多角形の粒子でほぼ揃っている。

以上3者の吸水能力はほとんど全く持たず，親水性の無い粒子である。

B. 水和性のある物質

ビニールアルコール樹脂 PVA　水和性のある高分子としてポリビニールアルコールを用いた。これは $CH_2=CH(OH)$ の重合物で微粉ではあるが，球形でなく繊維状の細長い形をしており，大きさは不揃いである。水中で 80°C 以上に加熱すると溶解してきわめて粘稠な溶液となる。

また PVA をアセタール化すると耐熱性，水和性が変化することが知られているので，硫酸々性で HCHO を作用させ，アセタール化度のちがつた試料2種を造つた。

$$-CH_2-CH(OH)-CH_2-CH(OH)-CH_2- \xrightarrow[\text{アセタール化}]{+HCHO} -CH_2-CH(O-CH_2-O)-CH_2-CH(O-CH_2-O)-CH_2-$$

この操作により PVA は熱水に不溶となり，固さを増す。

2. 実験方法

前報[2] 同様，クロカワカジキとキハダ精肉 1: 1 の混合物に 3% の食塩を加えて，塩ずり肉を作り，これに合成樹脂の小粒子を混和した。このすり身をケーシングに詰めて 80°C の湯に 45 分間浸漬して加熱を行ない，一晩放冷後測定を行なつた。補強効果は官能的に検するとともに物理的測定を行ない，また圧搾水分量 (10 kg/cm², 10秒 加圧) を求めた。

実　験　結　果

A. 水和性を持たぬ粒子の影響

1. 水和性のない粒子の補強効果

粒子の大きさの差による影響をさけるため，まず大きさのほぼ等しい約 100μ 前後の PVC, PVdC, 海砂を用いてその影響をみた。これら粒子を加えるとゼリー強度計で測定するカマボコのゼリー強度は高くな

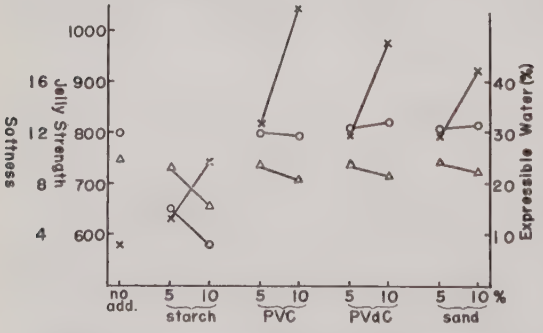


Fig. 1. Enhancing effect of hydrophobic particles (diameter; 100μ).
×; Jelly strength
○; Softness
△; Expressible water

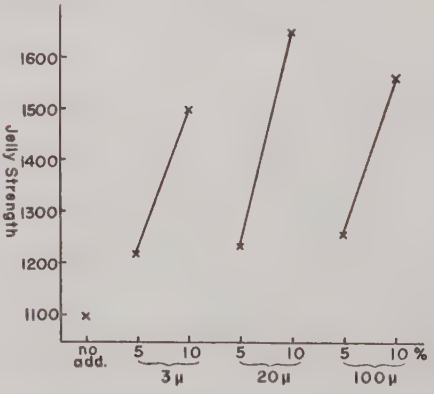


Fig. 2. Relation between reinforcing ability and size of PVC particle.

り，その効果は混和量が多くなる程大きくなる。しかし澱粉と違つて圧搾水分量にはほとんど影響を与えず，軟かさの値も大きく変化しない。特に外観的には澱粉の場合のように，きめの細かいなめらかな肌を作らず，また口に入れると異様な触感を与えてカマボコとしての足，しなやかさ，弾力を改善する作用は認められない。ゼリー強度を高くする効果は添加量 5% でははつきりした差は認められないが，10% の場合を比較すると 海砂 ＜PVdC ＜PVC の順に大きくなる (Fig. 1)。

2. 粒子の大きさ

PVC の大きさを変えて粒子の大きさの影響をみた。3μ, 20μ, 100μ の大きさのうちゼリー強度を増強させる力は 20μ が一番強く 20μ ＞ 100μ ＞ 3μ の順が認められ，粒子の大きさによつて効果の違うことが認められた (Fig. 2)。

B. 水和性のある粒子の影響

1. PVA の補強効果

短繊維の PVA 微粉を用いてその補強効果をみた。PVA は水中では 80°C に加熱するとゾルとなり冷却してもゲル化しない。しかし顕微鏡観察によれば PVA はカマボコ中では粒子のまま肉中に埋没していることが確かめられた。PVA は前記 PVC などと違つて肉のゼリー強度を高める以外に，圧搾水分量を減少させ，またなめらかな肌の外観を与える。口に入れるとしなやかな弾力のある食味で官能的にもカマボコとしての足が補強されたと判断され，その効果は澱粉とよく似ている (Fig. 3)。なお PVA を熱水に溶解させ粘稠な液としてすり身に加える実験を行なつたが，加熱肉は脆く，弾力のない水の出易いツミレ型のものとなる。これは予め糊化させた澱粉をすり身に加えた場合[2]と良く似ており，PVA も補強効果を現わすためには粒として肉中に混和されることが必要である。

2. アセタール化 PVA の効果

アセタール化した PVA を混和したカマボコは未処理 PVA を用いたものに較べ，ゼリー強度が高く，また固い感じを与える。しかし圧搾水分量も多くなり，口に入れた場合のしなやかさ，および弾力が低下する。この傾向はアセタール化の程度が進んだものほどはつきりと認められる (Fig. 4)。

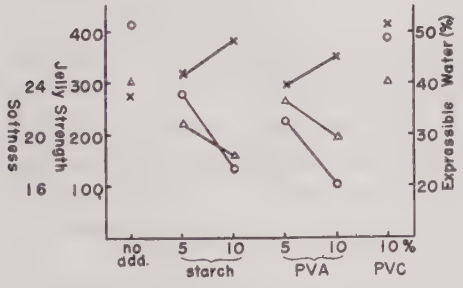


Fig. 3. Enhancing effect of polyvinyl alcohol particle.

×; Jelly strength
○; Softness
△; Expressible water

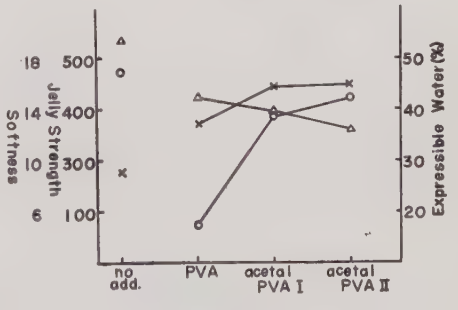


Fig. 4. Enhancing effect of acetal polyvinyl alcohol particles.
Degree of acetalization; II ＞ I.

×; Jelly strength
○; Softness
△; Expressible water

考　　察

A. 粒の機械的強度と補強効果

親水性がほとんど全くない PVC, PVdC, 海砂などの小粒子を加えると澱粉を混和したときのように，なめらかな，きめの細かいカマボコは得られない。また外観的にも圧搾水分量からみても保水性は改善されない。さらに口に入れたときの触感が悪く，添加粒子のざらつきが残り，しなやかさ，弾力が出ない等，官能

的にはこれら粒子の混和によりカマボコの足の補強が行なわれたとは認められない。しかし，肉が固く締りゼリー強度計による肉のゼリー強度測定値が著るしく高くなることが認められる。すなわち親水性を持たなくても機械的に丈夫な粒子が肉中に入るとゲルのゼリー強度は高くなることが判る。

実験 A-1 では大きさのほぼ同じ3種類の粒子を用い，ゼリー強度を増加させる効果が PVC＞PVdC＞海砂の順に弱くなることを認めた。粒の比重を較べると海砂 2.2, PVdC 1.7, PVC 1.3 である。同じ大きさの粒子を同じ重量加えた訳であるから，肉中の粒子の数は海砂＜PVdC＜PVC の順に多くなるはずである。これは補強効果の順と一致し，粒子の数がゼリー強度の増強に関係があるように考えられる。しかし実験 A-2 でみたように粒子の大きさの違つた PVC の効果は 20μ＞100μ＞3μ であり，粒子の数が一番多い 3μ が一番効果が小さい。このことからすれば単に粒子の数の多少のみでは説明しえない。他の考え方として粒子と肉蛋白との親和性が補強効果に関係することも考えられる。例えば肉と粒子がなじまなければプランジャーで押した場合互いにスリップしてゼリー強度が低く出ることも考えられる。しかし実験に用いた各粒子と肉との親和性については全く実験的根拠がないので想像の域を脱しない。

なお前述のように PVC の補強効果は粒の大きさで違い 20μ のものが一番大きいことをみた。ねり製品に使われている澱粉の澱粉粒の大きさは馬鈴薯 35μ，小麦大粒子 20～35μ，玉蜀黍 15μ である。実験に用いた3種の粒子のうちゼリー強度の増強効果の一番大きかつた粒子の大きさがこれら澱粉粒の大きさに一番近いことは興味ある事実である。これに関連してゼリー強度を増強するのに好適な粒子の大きさが存在するのではないかとも考えられる。例えば同じ重量の粒子を肉に加えても，大きな粒子であれば肉中には少数の粒子が分散することになり，ゼリー全体の性質に粒子の影響は現われ難くなる。また粒子の大きさが極端に小さく構成分子の次元近くの大きさになれば，溶解した PVA のように肉蛋白の網目構造の形成を阻害することが考えられよう。

以上のように水と全く親和性のない粒子は，官能的に認められるいわゆる足の補強効果はないが，肉のゼリー強度を著しく増強する効果をもち，ゼリー強度の増強に関する限りでは機械的に強い粒子の存在が必要であることが結論される。

この点に関連して内山ら[3]の行なつた魚肉ソーセージの一種の腐敗である軟化に関する研究は非常に興味がある。これは澱粉含有魚肉ソーセージの内部が部分的に軟化（ゼリー強度が著るしく低下する）する現象で，有芽胞桿菌の一種の増殖によるものである。軟化部分と非軟化部分とを比較すると蛋白の分解は認められないが，澱粉の分解が認められる。すなわち軟化部分の澱粉粒はその表面は沃度反応を示さず僅かに中央部のみが反応し，澱粉粒が周辺から細菌により消化されることが明らかにされている。すなわち軟化が起るのは足の補強に与つていた澱粉が細菌の酵素作用により消化されて粒の機械的強度が低下したためであると推論されよう。我々は澱粉を混和したすり身にアミラーゼを加えて加熱を行ない，アミラーゼを添加した製品はゼリー強度が低下すること，低下の度合はアミラーゼ量に比例することをみた。加熱中に澱粉がアミラーゼの作用を受けて粒の機械的強度が低下したためと考えられよう。

B. 粒子の水和性と補強効果

PVA を粉末のまますり身に加えると加熱肉のゼリー強度は増強されるばかりでなく圧搾水分量は少なくなり，食味，外観が向上するなど澱粉と同じような足の補強効果を示す。上記 PVC 等とはその効果が著るしく違つている。PVA は水に浸漬すると水を吸収して膨潤をし，またこれを加熱すると粘稠な糊となることからも判るように水との親和性がきわめて強い。一方，PVA をアセタール化すると耐熱性，機械的強度が増加することはよく知られた事実であり，繊維工業ではビニールアルコール系繊維製造の際にアセタール化して耐熱性，機械的強度を附与している。しかし，この反面水和性は低下し本実験で用いた試料でも冷水中の膨潤性が減少し，加熱しても溶解しなくなる。このアセタール化することによつて PVA の肉のゼリー強度を増強させる効果は強くなるが，一方圧搾水分量を減少させる効果は小さくなる，また外観，食味を向上させる作用も弱くなつて官能的にみた足の補強作用が低下する。このようなことは粒子の水和性が食味，外観の向上にきわめて密接な関係があることを示すものである。すなわち肉中に，水を吸収固定し，弾力に

富むしなやかな粒子が存在すること，これがカマボコとしての食味の改善，弾力の増加となつて現れるものといえよう。

糊化した澱粉粒と未糊化澱粉粒の一番大きな相違は糊化した澱粉粒が水を吸収して弾力のあるしなやかな粒子であることである。澱粉が水和性の小さい粒子から水和性の大きいしなやかな粒子に変ること――糊化することがカマボコの食味，外観の改善を行なう大きな原因であることは，以上のことから推測される。またこの粒の機械的強度が高いものであれば，カマボコのゼリー強度が高くなることは先に論じたことからも容易に想像される。

以上この2種のモデル実験からなぜ澱粉がねり製品の足に対して補強効果を現わすためには粒のまま肉中に混和され，その状態で糊化される必要があるかの理由について一応説明を与えることができたと考えられる。なを，澱粉粒についてその水和性，機械的強度などの物理的な性質がその補強効果といかなる関係をもつているかの検討については次報で述べる。

要　　約

澱粉のモデル物質として澱粉粒とほぼ同じ大きさの海砂およびビニール系合成樹脂の小粒子を用い，ねり製品の足に対する補強効果を調べた。

水和性のない海砂，塩化ビニールおよび塩化ビニリデン粒子を混和すると澱粉の場合のような食味，外観の改善は認められないが，肉のゼリー強度は著るしく高くなる。

ゼリー強度を高くする効果は粒子の種類によつて違い，海砂＜塩化ビニリデン＜塩化ビニールの順が認められる。

塩化ビニール粒子の効果は粒子の大きさによつて違い，ゼリー強度を高くする効果は $3\mu < 100\mu < 20\mu$ の順に強くなる。

水和性のあるポリビニールアルコール粒子はゼリー強度を高くするとともに，カマボコとしての食味，外観を改善する効果をもち，澱粉の効果とよく似ている。

ポリビニールアルコールをアセタール化して水和性を低下させるとゼリー強度を高くする効果は増すが，食味，外観を改善する効果は弱くなる。

以上のことから肉中に埋没している粒子の機械的強度がカマボコのゼリー強度に大きな影響を持ち，粒子の水和性の大小がカマボコの食味，外観を改善する能力と密接な関係をもつことが推測された。

本研究を行なうに当り，いろいろと御指導戴いた右田正男先生，また合成樹脂試料の入手に御援助下さつた東海区水産研究所下崎吉矩技官に御礼申し上げる。

文　　献

1) 岡田・山崎：本誌，**22**，583 (1957).
2) 岡田・山崎：本誌，**23**，476 (1957).
3) 内山・田中：本誌，**24**，148 (1958).

ねり製品の足に対する澱粉の補強効果—Ⅳ.

澱粉の物理的性質と補強効果

岡　田　　稔・山　崎　惇　子

日本水産学会誌
第二十五巻　第六号　別冊
昭和三十四年十月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 25, No. 6, Oct. 1959.

ねり製品の足に対する澱粉の補強効果—Ⅳ.

澱粉の物理的性質と補強効果

岡 田 稔・山 崎 惇 子

(1959 年 6 月 12 日受理)

ENHANCING EFFECT OF STARCH ON JELLY STRENGTH OF FISH MEAT JELLY—IV.

RELATION BETWEEN PROPERTIES OF STARCH AND REINFORCING ABILITY

Minoru Okada and Atsuko Yamazaki*

In the present paper, the properties of starch were investigated with particular reference to the ability reinforcing jelly strength of fish meat jelly.

In order to prepare starch samples with different properties, starches were modified to different degree by oxidation with hypochlorite or by aldehyde treatment. It was supposed that aldehyde treatment strengthened the granule by forming methyleneoxide bridge between starch molecules, and that starch grain was weakened by oxidation as a result of disintegration of amorphorous spots of granules.

Besides measuring pasting characteristics, strength of granules of modified starch samples were presumed from shape of cooking curve of viscogram by the Brabender Amylograph. Water imbibing ability of starch granules was determined by sedimentation volume.

Oxidized sample decreased in power reinforcing the jelly strength of Kamaboko with the increasing degree of treatment. The addition of aldehyde starch was more effective in enhancing the jelly than unmodified starch. It might be noteworthy that aldehyde potato starch had a distinct effect on enhancing the jelly strength, though it had less affinity for water.

From these facts, it was deduced that strength of starch granules had close relation with its ability reinforcing jelly strength, and that improvement of palatability and appearance of Kamaboko was done by action of water uptake of starch granules on pasting.

前報[1),2),3)]において澱粉が肉中で粒のまま糊化することが補強効果を現わすことに必要であること，および肉中に埋没している粒子の機械的強度および水和性がゼリーの性状に大きな影響を持つていることが推測されたので，澱粉を用いて粒子の物理的性質と補強効果との関係を求めることとした。

粒の物理的性質が異なる澱粉試料として馬鈴薯，小麦など，種類の異なつた澱粉を用いることも考えられるが，澱粉の種類によつて澱粉粒の大きさ，成分にはかなりの差があることが知られている (Table 1)。澱粉の性質がその種類によつて差があるのはこれら粒の大きさ，成分の相違によるも

Table 1. Properties of different starch varieties[4)].
澱粉の種類による性質の差

	Potato	Wheat	Corn
Mean size of starch grain (μ) 粒の大きさ	35	13	16
Gelatinization temperature (°C) 糊化温度	61.5	68.5	65.0
Phosphorous content 燐合量	0.095	0.03	0.12
Fatty acid content 脂肪酸合量	0	0.50	0.84

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab. Chuō-ku, Tokyo, Japan).

東海区水産研究所業績 B 第 315 号

のか，または澱粉粒自体の物理的性質の差によるものかは現在の澱粉化学の知識では不明である。それ故，澱粉試料として異種の澱粉を用いて実験することは問題が複雑となる。一方澱粉を薬品で処理すると粒を破壊することなしにその物理的性質を変化させうることが知られている。そこで同一種類の澱粉を用い，種々の段階に薬品処理を施して澱粉粒の性質を変えて実験試料となし，その補強効果をしらべることとした。

実 験 方 法

I. 薬品処理澱粉の調製

1. 酸化澱粉

酸化剤としては次亜塩素酸ソーダを用いた。次亜塩素ソーダ溶液は弱アルカリ性を示し，澱粉が膨潤糊化する恐れがあるので塩酸で中和して用いた。酸化剤の使用が多い程酸化の段階が進むことが知られているので，武富・鈴木の方法[5]に準じ，澱粉1グルコース残基（162g）当り，0.025～0.2 当量の塩素に相当する中和次亜塩素酸ソーダを加え，室温で 18 時間作用させて酸化馬鈴薯澱粉5種を調製した。

酸化玉蜀黍澱粉は日本食品化工 KK. 研究室に依頼して同様に酸化の程度の異なる試料3種を調製した。

2. アルデヒド処理澱粉

アルデヒドとしてはホルムアルデヒドを用いた。すなわち通常のアルデヒド処理澱粉の製法[6]にしたがい澱粉 100g 当り 0.2～1.2g のホルムアルデヒドを室温，塩酸微酸性で 18 時間作用させてアルデヒド処理馬鈴薯澱粉4種を調製した。アルデヒド玉蜀黍澱粉はこれに準じて日本食品化工 KK. 研究室に依頼調製した。

これらの酸化，アルデヒド処理を施した澱粉を顕微鏡観察したが，澱粉粒の破壊，膨潤等の変化は起きていないことが認められた。また粒の複屈析の喪失が起きていないことから糊化されていないと判断される。

II. 澱粉粒の物理的性質の判定

1. 澱粉の一般的性質および粒の機械的強度の判定

澱粉の一般的性質および澱粉粒の機械的強度の判定はアミログラムによつた。すなわち加熱による澱粉の糊化現象を追跡する機械，Brabender Amylograph を用いアミログラムを求めた。この機械は攪拌器をそなえた容器中で澱粉と水の混合物を一定速度で温度を上げながら攪拌しつつ加熱を行ない，攪拌器の受ける抵抗を加熱時間に対し自記的に記録させて粘度曲線（アミログラム）を得る一種の粘度計である。加熱温度が一定の終末温度（通常 95°C）に達したなら糊をその温度に保つことも，また一定速度で温度を下げて冷却しその間の粘度の変化をしらべることもでき，澱粉の一般的性質をみるのに適している。アミログラムの解釈[4]は容易ではないが，冷却曲線はいわゆる澱粉糊（糊化してできた澱粉溶液に膨潤澱粉粒の破片が浮遊したもの）の性質を示すもので，澱粉粒の性質を推定するには用いられない。しかし，加熱曲線は澱粉粒の物理的性質と密接な関係があることが知られている。すなわち加熱曲線の上昇部分は澱粉粒が膨潤して行く現象を現わすものである。加熱曲線に下降部分が現われるのは膨潤した粒が攪拌操作によつてひきさかれるためであることが顕微鏡観察により確かめられている。したがつて加熱曲線に高い山が出ることは澱粉粒が崩れ易い—機械的強度が弱いことを示している。また粘度の急激に上昇しはじめる温度，糊化開始温度の低いことは澱粉粒中における澱粉分子の結合状態の弱いことを示すものと考えられている。以上のことからアミログラムを求めることにより澱粉の一般的性質を知ることはもちろん，またその加熱曲線を比較すれば澱粉粒の機械的強度についての知識もえられると考えられる。そこでアミログラムを求め薬品処理した澱粉試料の性質を判定することとした。

2. 澱粉粒の吸水性の判定

澱粉粒は糊化する際，水を吸収して粒が著るしく膨潤する。そこで多量の水の存在下で澱粉の膨潤量を測定すれば粒の吸水性の目安がえられると考えた。ただし澱粉粒が操作中破壊しないことが前提となる。このため澱粉懸濁液を入れた容器を時々軽く振盪しながら 85°C の湯浴中に 20 分浸漬して加熱を行ない，えられた澱粉糊をシリンダーに移し一晩放冷後沈降容積を測り膨潤量を求めた。膨潤量と澱粉濃度との関係を求

めると 1～2% の間では直線的関係がある (Fig. 1)。この実験では澱粉の濃度は 2% に決めて沈降量を測定し，溶液に対する容量 % で膨潤量を現した。なお顕微鏡観察により澱粉粒の状態をチェックしたが，通常の未処理澱粉では上記の操作で澱粉粒はほとんど破壊することなく膨潤することが認められ，この方法で求めた膨潤量を澱粉粒の吸水能力の目安となしうると考えた。

III. 補強効果の判定

前報[2] 同様クロカワ＋キハダの塩ずり肉に澱粉試料 10% を混和，80°C, 45 分間加熱，一晩放冷後，官能検査および物理的測定によつて補強効果を判定した。

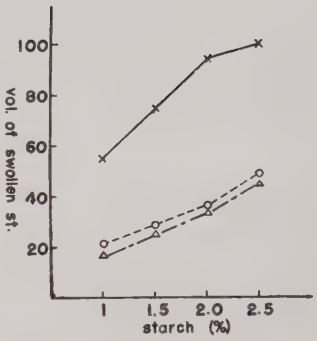


Fig. 1. Swelling of starch.
×: potato starch.
○: wheat starch.
△: corn starch.

実 験 結 果

1. 馬鈴薯酸化澱粉（吸水性は変化せず，粒の機械的強度が低下した澱粉）

アミログラム　未処理澱粉ではアミログラム (5%) の加熱曲線に山が認められないが，酸化処理したものには山が現われるようになる。しかも酸化の段階が進む程山の形は鋭どくなり，山の高さはしだいに低くなる (Fig. 2)。これは酸化の進んだもの程，粒が膨潤し易くなり，しかも膨潤した粒が攪拌によつて崩壊されやすくなつたことを示すもので，酸化処理が進むほど澱粉粒の機械的強度は弱くなるものと推定される。

膨潤性　軽度の酸化処理をしても膨潤量は増加して膨潤量は100% に達してしまい，その後の変化が判らない。顕微鏡観察結果では処理によつて粒の膨潤状態はほとんど変らない。ただ処理が進むと（試料 D, E),膨潤量がやや減り，顕微鏡観察すると大粒子が崩壊して小粒子のみが残つている。この膨潤量の減少は澱粉粒，特にミセル構造の弱い大形澱粉粒の機械的強度が低下したことによるものと考えられ，アミログラムの挙動と一致する。

以上のことから，馬鈴薯澱粉はある程度の酸化処理では吸水性には大きな変化は起らないが，粒の機械的強度は低下するものと考えてよかろう。

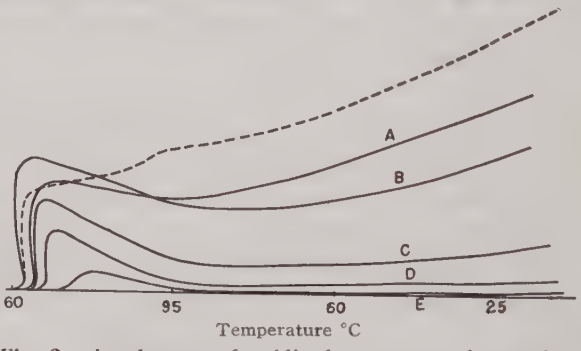


Fig. 2. Amylogram of oxidized potato starch samples. Degree of treatment increased A → E. Broken line represented of unmodified starch.

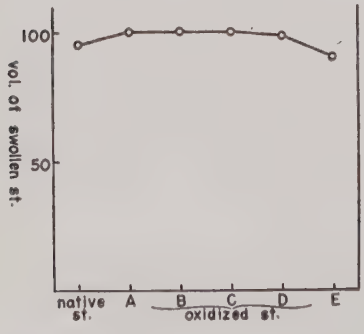


Fig. 3. Water imbibing ability of oxidized potato starch samples.

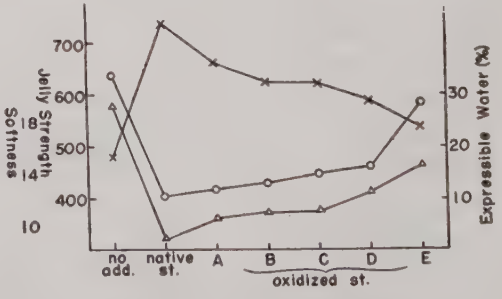


Fig. 4. Enhancing effect of oxidized potato starch samples.
×; Jelly strength. ○; Softness.
△; Expressible water.

補強効果　酸化澱粉を入れたカマボコは，未処理澱粉のそれに較べて弾力が弱く，しまりが足りない。この傾向は酸化の段階が進む程著るしく，酸化の程度の高い試料 D や E では澱粉を入れた影響がはつきり認められなくなる。このことはゼリー強度の測定でも認められ，酸化の進んだものほど肉のゼリー強度は低下し，軟かさの値，圧搾水分量がふえていく (Fig. 4)。

2. 玉蜀黍酸化澱粉（吸水性は増加，機械的強度が低下した澱粉）

アミログラム　粘度がきわめて低いため，7% 澱粉濃度ではアミログラムが画けない。そこで澱粉濃度を 15% に上げてアミログラムを求めた (Fig. 5)。冷却曲線には高い粘度がみられず，加熱曲線に顕著な山が認められる。酸化の進むにつれ山の高さは低くなり，また左に移動して糊化開始温度が低くなることが判る。このことから酸化が進んだもの程，澱粉粒内のミセル構造がゆるみ機械的強度が弱くなつていることが窺われる。

膨潤性　膨潤量は未処理に較べて著るしく増加するが (Fig. 6)，顕微鏡で観察すると酸化の進んだものほど膨潤粒の数が少なくなり，特に試料Cでは粒が崩壊して粒の存在はほとんど認められない。粒が膨潤と同時に分散して溶液となつてしまうためであろう。また試料Cの濃厚溶液（20%）は冷却してもゲルを形成しなくなる。

以上のことから玉蜀黍酸化澱粉は膨潤性—吸水性は大きくなるが，粒の機械的強度は逆に低下すると判断される。

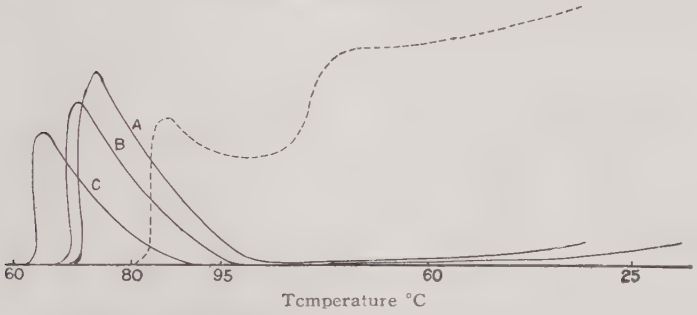


Fig. 5. Amylogram of oxidized corn starch samples. Degree of treatment increased A → C.

補強効果　酸化の進むにつれて補強効果は弱くなり，肉のゼリー強度は低下する。特に酸化の進んだ試料Cでは弾力のあるカマボコとはならず，脆い水の出易い“ツミレ”を作り，足の形成を阻害する場合もある (Fig. 7)。

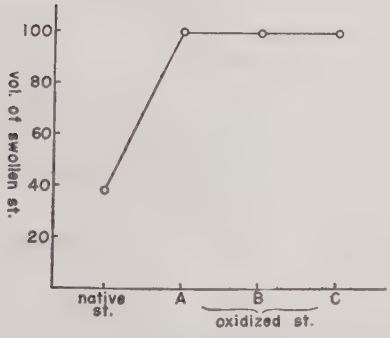


Fig. 6. Water imbibing ability of oxidized corn starch samples.

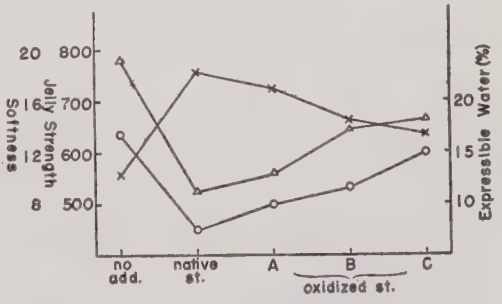


Fig. 7. Enhancing effect of oxidized corn starch samples.
×; Jelly strength. ○; Softness.
△; Expressible water.

3. 玉蜀黍アルデヒド処理澱粉（吸水性は変らず，機械的強度が高くなつた澱粉）

アミログラム　加熱温度が 95°C に達してから 30 分間その温度で測定を続けると，未処理玉蜀黍澱粉 (7%) では粘度曲線に山が現われてくる。アルデヒド処理が進むとこの山が認められなくなり，また粘度が高くなる (Fig. 8)。これは膨潤粒が攪拌によつて破壊され難くなることを意味し，アルデヒド処理により粒の機械的強度が高くなるものと判断される。

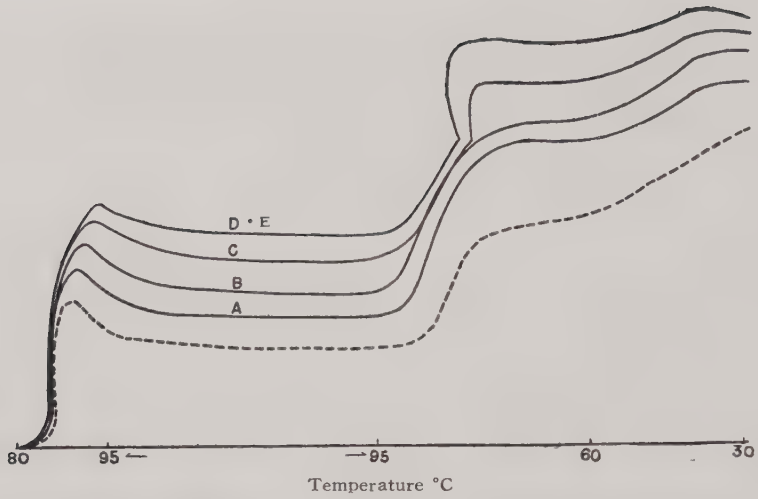


Fig. 8. Amylogram of aldehyde corn starch samples.
Degree of treatment increased A → E.

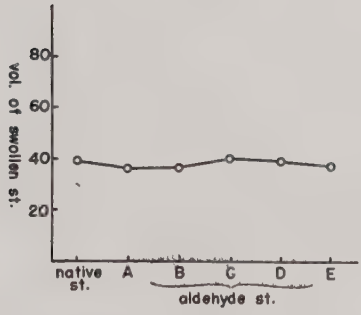


Fig. 9. Water imbibing ability of aldehyde corn starch samples.

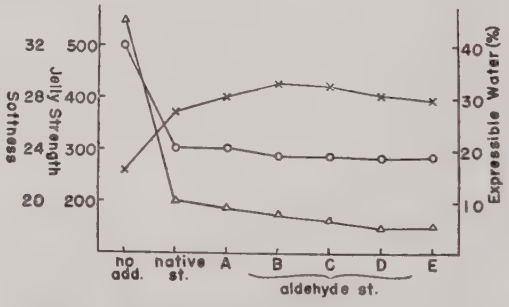


Fig. 10. Enhancing effect of aldehyde corn starch samples.
×; Jelly strength. ○; Softness.
△; Expressible water.

膨潤量　処理による膨潤量の変化はほとんど認められず，未処理澱粉とほぼ同じである (Fig. 9)。また顕微鏡観察によつても膨潤の様相に差はみられない。このことから粒の水を吸収する能力はアルデヒド処理をしても変化を受けないと考えられる。ただし，未処理澱粉でも玉蜀黍澱粉は馬鈴薯澱粉に較べ膨潤量がきわめて小さいことは興味ある事実である。

以上のことから玉蜀黍澱粉はアルデヒド処理により，澱粉粒の吸水性は変化をを受けないがその機械的強度を増すと考えられる。

補強効果　処理澱粉を入れた肉はやや固さを増し，歯切れがよく弾力が強くなる。ゼリー強度の測定でもこの傾向が認められるが，処理がある程度進むとゼリー強度はやや低下するようである (Fig. 10)。

4. 馬鈴薯アルデヒド処理澱粉（吸水性が低下，機械的強度の高くなつた澱粉）

アミログラム　アルデヒド処理した馬鈴薯澱粉は粘度曲線が次第に低下し，また上昇曲線の傾斜がゆるくなる。処理が進んだものでは粘度曲線に上昇部がほとんど見られない (Fig. 11)。このようなことはアルデヒド処理により澱粉粒が膨潤し難くなつたことを示すものと思われる。

膨潤性　膨潤量は処理の進むにつれて減少することが認められ (Fig. 12)，アミログラムの挙動と一致する。また顕微鏡観察を行なつても粒が膨潤し難くなることが観察された。なお処理の進んだもの（試料D）の膨潤量は未処理の玉蜀黍，小麦澱粉の値よりやや小さい。

このように馬鈴薯澱粉をアルデヒド処理すると粒の膨潤は低下し吸水性が少なくなることが推測されるが，粒の機械的強度の変化はこの実験のアミログラムからでは判断できない。しかし，他の実験で得たアミログラムでは加熱中の澱粉粒の崩壊が抑えられる結果*(第V報，Fig. 1) が得られているので，粒の機械的強度はアルデヒド処理により強められると思われる。これらの事実からアルデヒド処理によつて粒の吸水性は低下し，機械的強度は増すものと判断した。

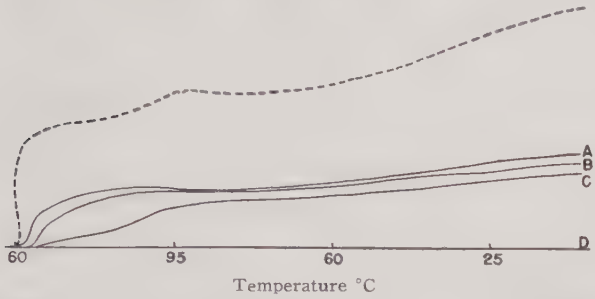


Fig. 11. Amylogram of aldehyde potato starch samples. Degree of treatment increased A → D.

補強効果　未処理澱粉に較べて歯切れがよくなり，官能的には弾力も増して補強効果が強くなつたと判断されるが，ゼリー強度の測定では処理による変化はほとんどなく，軟かさの値が少なくなることが認められる (Fig. 13)。

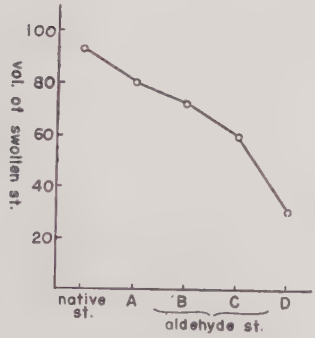


Fig. 12. Water imbibing ability of aldehyde potato starch samples.

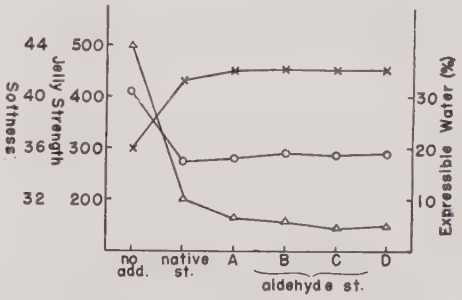


Fig. 13. Enhancing effect of aldehyde potato starch samples.
×; Jelly strength. ○; Softness.
△; Expressible water.

考　　察

酸や酸化剤で澱粉を処理すると澱粉糊の粘度が著しく低下するので，いわゆる thin-boiling starch として各方面で大量に使用されている。このような澱粉はその澱粉粒は複屈析を示し外観的には未処理澱粉と変りはないが，水中で糊化させると膨潤と同時に粒がばらばらに崩れ低粘度の糊を作るのが特徴である。酸や酸化剤が澱粉粒中の非晶形部分を選択的に攻撃しミセル間の結合を弱めるためと解釈されている。

また澱粉をアルデヒド処理すると澱粉分子間にメチレンオキサイド橋 (-O-CH_2-O-) が形成され，粒の構造がこれによつて強められるとされており，事実アルデヒド処理をすると粒の機械的強度が強くなることを示すアミログラムが得えらる。またアルデヒド処理が強くなると澱粉粒中のミセル間の結合が強められ水のとり入れが妨害されて膨潤しなくなるといわれているが，馬鈴薯澱粉の場合にはこの現象がはつきり認められた。なを，玉蜀黍澱粉ではこの現象がみられなかつたが，その理由については判らない。

このように酸化またはアルデヒド処理など適当な薬品処理を施すことにより，同一種類の澱粉を用いて粒子の物理的性質の違う試料をえようとする当初の目的は達成することができた。このようにしてえられた澱粉粒子の物理的性質と補強効果との関係を定性的ではあるがまとめてみると Table 2 のようになる。この

* このようにアミログラムの様相が違つたのは未処理澱粉の粘度曲線からみて澱粉の濃度が違うことも原因の一つと考えられる。

Table 2. Relation between properties of starch granules and their reinforcing ability.

Modified method 処理方法		Properties of starch grain 澱粉粒の性質		Properties of Kamaboko 加熱肉の性状			
		Mechanical strength 機械的強度	Water imbibing ability 吸水性	Jelly strength ゼリー強度	Softness 軟かさ	Water retention 保水性	Organoleptic judge 足の強さ
Potato starch 馬鈴薯澱粉	Unmodified 未処理	##	##	##	##	##	##
	Oxidation 酸化	+	##	+	###	+	+
	Aldehyde treatment アルデヒド処理	(###)	+	###	+	##	###
Corn starch 玉蜀黍澱粉	Unmodified 未処理	##	##	##	##	##	##
	Oxidation 酸化	+	###	+	###	+	+
	Aldehyde treatment アルデヒド処理	###	##	###	+	##	###

Property of unmodified starch as standard was shown as ##.

表から，カマボコとしての足の強さ，および加熱肉のゼリー強度の大小は澱粉粒の機械的強度の大小と相関があること，また澱粉粒の機械的強度は加熱肉の軟かさと逆相関であることが認められる。しかし，粒の吸水性と肉の保水性（圧搾水分量で判定した）との間にはつきりした関係は認められない。

澱粉を用いた本実験でも，前報[3]のモデル実験で得られた“肉中に埋没している粒子の機械的強度が肉のゼリー強度と密接な関係がある”という推論が確かめられたといえよう。また粒の吸水性の大小は官能的に判断した足の強さとも，物理的測定による保水性とも相関が認められないこと，さらに馬鈴薯アルデヒド澱粉のように粒の吸水性が低下しているにも拘わらずかなり強い補強効果を持つていることを考えると，澱粉が粒中に水を吸収しうる能力の大小は補強効果とは特に関係がないように思われる。食味，外観を向上させるためには，澱粉粒が糊化して弾力のある粒子に変わるのに必要な程度の吸水能力があれば充分であると考えられる。なおこの点に関連し，本研究では肉に加える水の量を 30 %とし澱粉添加量 10%（カマボコの水分 78% 前後）として実験を行なつているが，肉に加える水の量を変えた場合には，澱粉粒の吸水性の大小も補強効果の強弱に関係することが考えられる。例えば Fig. 1 でみたように小麦澱粉の吸水性は馬鈴薯に較べて非常に小さい。志水等[7]は小麦澱粉は加水量を多くした場合に澱粉の補強効果が馬鈴薯澱粉に較べて低下し易いことをみているからである。

以上前報からの実験結果より澱粉の補強機作についてつぎのように結論されよう。

1. 澱粉が足の補強効果を現わすためには，肉中で澱粉粒のままで糊化されることが必要である。

2. 糊化にあたり澱粉粒が肉中の水をひき入れて水和性の大きなしなやかな弾力のある粒子とかわり，食味，外観の改善に関与する。しかし澱粉粒の吸水性の大小は補強効果と特に関係はなく，粒の水和性は糊化することにより満足される。

3. 澱粉粒の機械的強度はねり製品のゼリー強度および足の強さと密接な関係をもち，肉中に埋没している澱粉粒の機械的強度が肉のそれより大きくなれば，ねり製品の足は増強される。

要　　約

1. 澱粉粒の物理的性質と，そのカマボコの足に対する補強効果との関係を求めるため，同一種類の澱粉をいろいろの段階に薬品処理して粒の物理的性質を変え，その補強効果をみた。

2. 馬鈴薯澱粉を酸化すると，粒の吸水性は変らないが機械的強度が低下し，補強効果は酸化の進んだも

のほど弱くなる。

3. 玉蜀黍澱粉を酸化すると，粒の吸水性は増加するが機械的強度は低下し，補強効果も弱くなる。

4. 馬鈴薯澱粉をアルデヒド処理すると，粒の吸水性は低下するが機械的強度は増すと考えられ，補強効果は強くなる。

5. 玉蜀黍澱粉をアルデヒド処理すると，粒の吸水性はほとんど変化しないが機械的強度は増大し，補強効果も強くなる。

6. 澱粉粒の機械的強度の大小はこれを添加したカマボコのゼリー強度と密接な関係があり，足の補強効果の大小と一致する。澱粉粒の吸水性はある程度あれば充分であり，その大小と足の補強効果との間にはつきりした関係は認められない。

7. 第Ⅰ報から本報までの実験結果から，澱粉がカマボコの足の補強効果を現わすためには澱粉粒が肉中に埋没したままで糊化することが必要であり，糊化にあたり肉中の水を吸収，固定して水和性の大きな粒子とかわるため食味，外観を改善し，また澱粉粒の機械的強度が魚肉のそれよりも大きくなるためゼリー強度，弾力を増強するものと考えられる。この2つの作用が澱粉がねり製品の足を補強する主な機作と推論される。

本研究を行なうにあたり，御指導戴いた右田正男先生，玉蜀黍澱粉試料を調製して下さつた日本食品化工KK. 研究室，またアミログラフを使用させて下さつたお茶の水大学福場助教授，および味の素KK. 食品研究室の諸氏に厚く御礼申し上げる。

文　　献

1) 岡田・山崎：本誌，**22**，583 (1957).
2) 岡田・山崎：本誌，**23**，476 (1957).
3) 岡田・山崎：本誌，**25**，435 (1959).
4) G. W. Scott Blair: Foodsfuffs, 1～34 (1953)., North-Holland Pub.
5) 武富・鈴木：工業化学雑誌，**57**，148 (1954).
6) R. W. Kerr: Chemistry and Industry of Starch, 73 (1950)., Academic Press.
7) 志水・清水：本誌，**20**，895 (1955).

ねり製品の足に対する澱粉の補強効果—V.

薬品処理澱粉の利用

岡田　稔・山崎惇子

日本水産学会誌
第二十五巻　第六号　別冊
昭和三十四年十月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 25, No. 6, Oct. 1959.

ねり製品の足に対する澱粉の補強効果—V.
薬品処理澱粉の利用

岡田 稔・山崎惇子

(1959 年 6 月 12 日受理)

ENHANCING EFFECT OF STARCH ON JELLY STRENGTH OF FISH MEAT JELLY—V.
APPLICATION OF MODIFIED STARCH TO KAMABOKO MANUFACTURE

Minoru Okada and Atsuko Yamazaki*

It seemes that starch with any desired enhancing effect can be obtained by modifing to appropriate thick or thin boiling starch. For example, reinforcing ability of starch can be strengthened by aldehyde treatment, a method of preparing thick boiling starch. And, thin boiling starch such as oxidized or acid modified starch is suitable for large amount addition without lowering the quality of Kamaboko.

水産ねり製品の製造の際用いられる澱粉は主に馬鈴薯および小麦澱粉で，甘藷，玉蜀黍澱粉はごく一部で使われるに過ぎない。しかし馬鈴薯澱粉はゼリー強度を高くするが固く締り過ぎるとか，小麦澱粉は逆に締りが悪く足が弱いといわれ，澱粉の種類によつて補強効果の様相が大分違つている。また澱粉を多量に添加すると澱粉団子のような食味となり，ねり製品としての風味が著しく悪くなる。澱粉はその種類特有の物理的性質を持ち，糊化した後でもその特徴を残していることからすれば，単一の種類を用いて補強効果の様相を変え，また食味の違つた製品をつくることは難かしいと考えられる。このためには馬鈴薯と小麦というように種類の違う澱粉を混合して使用することも一つの方法であろう。前報[1]で澱粉を薬品で処理すれば粒の機械的強度，吸水性等物理的性質の種々違つた澱粉を作ることができ，その補強効果も違つてくることを明らかにした。単一澱粉を用いても適当な薬品処理を施すことにより，製造目的に応じ補強効果の様相の違つた澱粉を使用することが可能となり，さらに肉蛋白と澱粉を組合せた新しい製品の製造もできるようになることが推測される。

実　　験

1. 薬品処理澱粉の調製

馬鈴薯，小麦，玉蜀黍の 3 種の澱粉を用いアルデヒド，酸化，および酸処理を行つた。

A．アルデヒド処理——塩酸微酸性で HCHO を 18°C, 24 時間作用させる。

B．酸化処理——塩酸で中和した晒白粉溶液に澱粉を 18°C，1 時間浸漬する。

C．酸処理——硫酸の 0.1 規定液中に澱粉を 50°C で 5 時間浸漬する。

薬品処理の終つた澱粉はよく水洗し風乾して試料とした。いずれの場合も澱粉粒の破壊は行われず，粒の複屈折性も消失していない。前報[1]同様アミログラムを求めて澱粉の一般的性質を見た。

2. 澱粉の補強効果の判定

グチの塩ずり肉に澱粉試料を 10% 加え，これをケーシングに詰めて 80°C の湯に 45 分間浸漬して加熱を行ない，一晩放冷後補強効果を調べた。すなわち官能的に判定するとともに三宅式ゼリー強度計によつて物理的測定を行い，同時に圧搾水分量を求めた。

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab. Chuō-ku, Tokyo, Japan).

東海区水産研究所業績 B 第 316 号

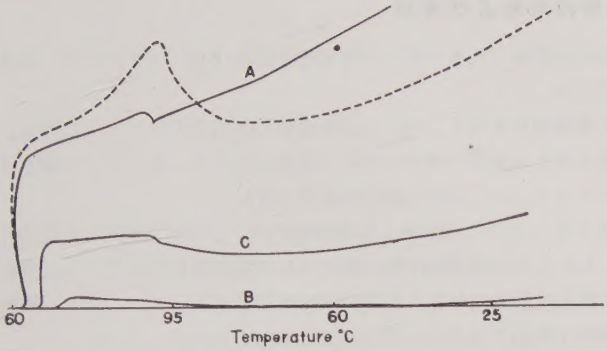


Fig. 1. Amylogram of modified potato starch samples.
A; Aldehyde starch. B; Oxidized starch.
C; Acid modified starch.
Broken line represented of unmodified starch.

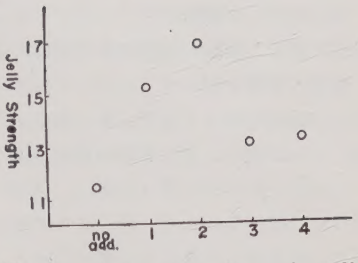


Fig. 2. Enhancing effect of modified potato starch samples.
1; Unmodified starch.
2; Aldehyde starch.
3; Oxidized starch.
4; Acid modified starch.

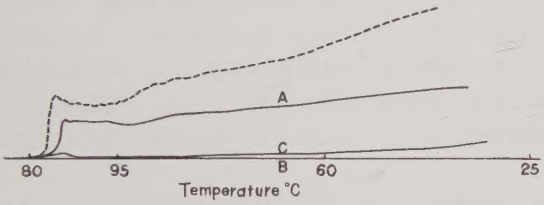


Fig. 3. Amylogram of modified wheat starch samples.
A; Aldehyde starch. B; Oxidized starch.
C; Acid modified starch.

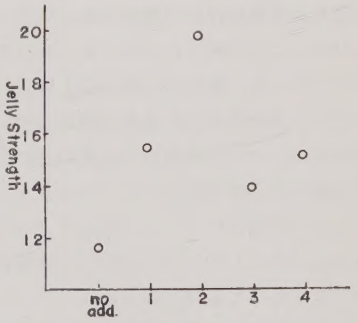


Fig. 4. Enhancing effect of modified wheat starch samples.
1; Unmodified starch.
2; Aldehyde starch.
3; Oxidized starch.
4; Acid modified starch.

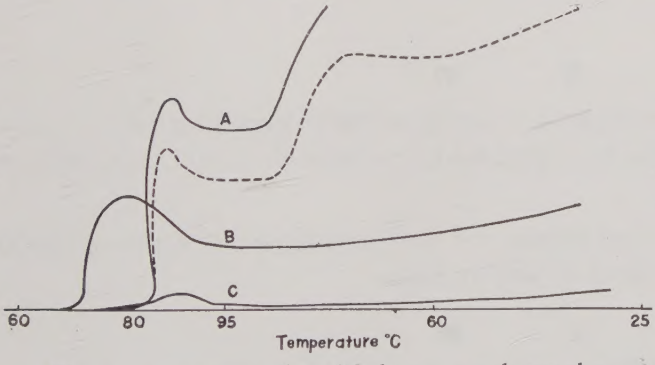


Fig. 5. Amylogram of modified corn starch samples
A; Aldehyde starch. B; Oxidized starch.
C; Acid modified starch.

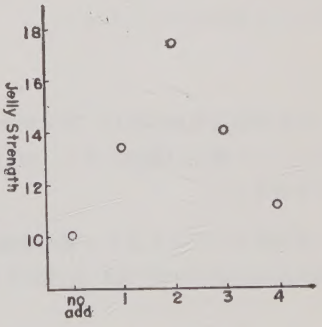


Fig. 6. Enhancing effect of modified corn starch samples.
1; Unmodified starch.
2; Aldehyde starch.
3; Oxidized starch.
4; Acid modified starch.

実験結果および考察

薬品処理した澱粉のアミログラムおよびこれを混和したカマボコの物理的性質を Fig. 1～6 に示す。薬品処理を施すと澱粉の補強効果が非常に違つてくる。

澱粉の種類を問わずアルデヒド処理すると補強効果を増し，特に官能検査をした場合のカマボコの締り，および歯切れがよくなる。また酸化または酸処理した澱粉では肉のゼリー強度は低下し，カマボコの締りは弱くなるが柔く，また普通の澱粉のようにネチネチしたいわゆる澱粉味を感じない。

このことから肉の締りが悪く，ゼリー強度を高めるのに難がある小麦澱粉にはアルデヒド処理*を施せばこの点は改善されるし，固く締りすぎるといわれる馬鈴薯澱粉は軽い酸化または酸処理をすれば，柔い食味のよい製品ができることが考えられる。また酸化や酸処理を施した澱粉は補強効果は弱いが，いわゆる澱粉味（粉つぽい食味）が少いので肉に多量に澱粉を混和するさいの食味の低下を防ぐのに適している。

なを澱粉を含有するカマボコ類の保蔵性をまさせるために，薬品を用いてあらかじめ澱粉を殺菌する方法が考えられている[2),3)]。しかし殺菌剤として酸[2)]や酸化剤[3)]を用いる場合には本実験結果から澱粉の補強効果を低下させる恐れがある。したがつて澱粉の殺菌を行うには，補強効果の面をも併せ考えて検討する必要があろう。

従来甘藷澱粉はねり製品の製造に使用されることはほとんどなかつたが，これは甘藷澱粉は色が黒いため，色の白いことが好まれるカマボコには向かないという理由もあるが，補強効果が弱いことが大きな原因と考えられている。澱粉の白度の向上は澱粉製造工程の改良により達せられるし，また補強効果の弱いこともアルデヒド処理等適当な薬品処理を行なえば改善することができよう。これらの点につき研究が進めば従来使用されなかつた甘藷澱粉を水産ねり製品に使用することができるようになり，生産過剰で困つている甘藷澱粉の直接利用面を開拓する1つの道となろう。しかし同一処理を施しても澱粉の種類によつてその影響が違うことが経験されている。例えばアルデヒド処理により馬鈴薯澱粉の吸水性は減少するが，玉蜀黍澱粉ではほとんど変化しない[1)]。また同一種類の澱粉でも薬品処理の条件が少しでも変ると処理澱粉の性質が大きく違つてくることも知られている。

以上のことから薬品処理澱粉を使用するには，個々の澱粉について，それぞれの薬品処理方法について精しく研究する必要があり，澱粉専門家と協同して行なうべき今後の研究課題であろう。

薬品処理澱粉は水産ねり製品に限らず他の食品でも大いに利用しうると考えられる。例えばソバ，ウドン等の麺類やパン等は澱粉が粒のまま混和され，しかも加熱中に攪拌されることなしに糊化する食品であるが，澱粉が粒のまま存在すると考えられ，カマボコの場合と同様澱粉粒の性質がこれら食品の物理的食味に大きな影響をもつことが想像される。したがつてこれら食品の品質改善法として薬品処理澱粉を利用することはかなりの期待がかけられよう。

要　　約

澱粉を薬品処理すれば，粒の物理的性質を変えることができ，ねり製品の足の補強効果を変えることができる。ねり製品の製造に当り，製造目的に応じて補強効果のちがつた澱粉を用いるため，薬品処理澱粉の使用を提案した。

本研究を行なうにあたり御指導戴いた右田正男先生，アミログラフを使用させて下つたお茶の水大学福場助教授並びに味の素 KK 食品研究室の諸氏に厚く御礼申し上げる。

文　　献

1) 岡田・山崎：本誌，**25**，440 (1959).
2) 横関・大島：北海道水試報告 No. 7, 1 (1950).
3) 曾々木：本誌，**23**，793 (1958).

* 実際に使用する場合にはホルムアルデヒドの代りに毒性のないアセトアルデヒド等を用いるべきである。